

Human neuropsin遺伝子と精神疾患・認知機能との関連

泉 愛子

奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科 細胞構造学講座
(塩坂 貞夫 教授)

平成 21 年 1 月 26 日提出

目次

第1章 HUMAN NEUROPSIN遺伝子多型と精神疾患・認知機能との関連解析	4
序論.....	5
1. 精神疾患の臨床遺伝学背景.....	5
2. 多因子疾患の遺伝子解析研究	6
3. 精神疾患の分子病態.....	8
4. 中間表現型 (ENDOPHENOTYPE) と精神疾患	9
5. シナプス可塑性とNEUROPSIN (NP)遺伝子.....	10
本研究第1章の目的.....	12
第1章 1-1 : HUMAN NEUROPSIN遺伝子多型と精神疾患との関連解析および関連SNPsの機能解析	13
目的	14
対象と方法	14
1. 対象 (SUBJECTS).....	14
2. 患者-健常対照群間比較関連解析 (CASE-CONTROL ASSOCIATION STUDY).....	14
2-1 SNPs検索.....	14
2-2 制限酵素断片長多型 (RFLP) 解析.....	17
2-3 SNP genotyping	17
2-4 単点SNP関連解析 (Single SNP association study).....	18
2-5 連鎖不平衡解析.....	20
2-6 ハプロタイプ解析	22
3. 転写調節領域にあるSNPsの機能解析	23
3-1 hNP発現調節領域ゲノムコンストラクト作製.....	23
3-2 生後ラット中枢神経細胞の初代培養法.....	25
3-3 ヒトNeuroblastoma細胞の培養法.....	26
3-4 遺伝子導入法.....	27
3-5 ルシフェラーゼアッセイ法.....	27
結果.....	28
SNPs検索.....	28
患者-健常対照群間比較関連解析.....	29
1. 単点SNP関連解析 (Single SNP Association study).....	29
2. 連鎖不平衡解析.....	30
3. ハプロタイプ解析.....	30
転写調節領域にあるSNPsの機能解析	31

第1章 1-2：認知機能に与えるHUMAN NEUROPSIN遺伝子多型の影響.....	33
目的	34
対象と方法	34
1. 対象 (SUBJECTS).....	34
2. 神経心理学的検査 (NEUROPSYCHOLOGICAL TEST).....	35
3. SNP GENOTYPING	35
4. アポリポ蛋白E (APOE) 遺伝子型の決定.....	35
5. 統計解析	37
結果	38
考察.....	40
第2章 HUMAN NEUROPSIN遺伝子多型とアルツハイマー病との関連解析.....	47
序論	48
目的	49
対象と方法	49
1. 対象 (SUBJECTS)	49
2. SNP GENOTYPING	50
3. アポリポ蛋白E (APOE) のアイソフォームと遺伝子型	50
4. 統計解析.....	51
結果	52
アルツハイマー病—健常対照群間比較関連解析	52
1. 全対象者による解析 (全てのApoEアイソフォームを含む)	52
2. 対象者：ApoE3 アイソフォームのみ持つ人 ($\epsilon 3\epsilon 3$ 遺伝子型の人)	52
考察	54
謝辞	55
参考文献.....	57
図表	70

第 1 章

Human neuropsin遺伝子多型と

精神疾患・認知機能との関連解析

序論

1. 精神疾患の臨床遺伝学背景

精神疾患とは、思考、情動、社会的交流など「こころ」の現れとして考えられる事が多い要素に障害がある疾患で、その代表的な疾患として統合失調症、単極性うつ病、躁うつ病（双極性障害）が挙げられる。単極性うつ病、躁うつ病は合わせて気分障害と呼ばれる。

統合失調症は、多くは思春期、青年期に発症する精神疾患で、思考、知覚、情動、意欲、行動などに関わる多彩な症状が組み合わさって現れる。症状は大きく陽性症状と陰性症状に分けられ、前者には幻覚や妄想、緊張病様の行動、思考の解体、奇妙な行動などがあり、後者には感情の平板化、思考の貧困、意欲の欠如、注意力の欠如、自閉などがある。単極性うつ病の症状としては、興味・関心の低下、抑うつ気分、自責感、不眠、食欲不振などがみられ、躁うつ病の症状としては、うつ病相のみならず、躁病相の症状である過活動、多弁、爽快気分などがみられる。

統合失調症や気分障害の病因に遺伝的要因が関与していることは、家系研究・双生児研究・養子研究など臨床遺伝学的所見から明らかとされている。例えば、統合失調症の場合、一般集団における発病危険率は1%であるが、親や同胞が罹患者であると、危険率は約10倍になる。また、二卵性双生児の片方が罹患している場合の同胞の発病危険率は約17%であるのに対して、一卵性双生児では約50%であり、一卵性双生児と二卵性双生児の発病一致率が大きく異なることから、病因として遺伝的要因が強く関与することが示唆されている(Cardno et al., 1999)。養子研究においては患者の育ての親よりも実の親に統合失調症が多く、この点からも遺伝的要因が重要であることが示唆される(Heston, 1966; Tienari, 1991)。気分障害である単極性うつ病、躁うつ病に関しても、罹患者の第1度親族の危険率は一般集団中における発病率に比べて、単極性うつ病では約3倍(Gershon et al., 1982; Nurnberger, 1986)、躁うつ病では約10倍以上となる(Craddock and Jones, 1999)。双生児研究においても、躁うつ病の一致率は二卵性より一卵性の方が高いとされ(Nurnberger, 1992)、単極性うつ病においてもその傾向が見られる(Allen, 1976; Kendler et al., 1992)。養子研究では、単極性うつ病、躁うつ病のどちらにおいても実父母の精神病理の影響の方が、養父母よりも強いことが示されている(Mendlewicz and Rainer, 1977)。

これらの背景は、精神疾患の発症には遺伝的要因が大きく関わっていることを示しているが、どの精神疾患においても、一卵性双生児の一致率が100%に達していないことから、発症要因には胎生期・周産期におけるものを含めた環境要因および社会心理学的要因も関与していることが示唆される。また、同じ病名を診断されたとしても、発症年齢や病状は患者によって異なることが多い。これらのことから、統合失調症や

気分障害は複数の要因が関与する多因子疾患と考えられている。

2. 多因子疾患の遺伝子解析研究

多因子疾患は、「複数の遺伝的要因と複数の環境要因の効果の組み合わせにより決定される疾患」と定義することができる。多因子疾患である統合失調症、単極性うつ病、躁うつ病の一般集団におけるそれぞれの罹患率は1%、6~15%、0.2~1.6%とされ、生活習慣病と同様に、頻度が高い疾患として **common disease** (ありふれた疾患) とも呼称される。多因子疾患の疾患感受性遺伝子同定のための遺伝学的アプローチは、大きく分けると2つあり、連鎖解析により疾患感受性遺伝子の位置的候補を取り上げる位置的候補遺伝子法と、病態などの知見から候補を取り上げる機能的候補遺伝子法がある。

前者の連鎖解析 (**linkage study**) とは、古典的には、大家系あるいは罹患同胞対を用いて家系内での遺伝マーカーとなる対立遺伝子 (**Allele**: アレル) の伝達パターンを調べ、罹患者において有意に高頻度に伝達されている染色体領域を特定し、疾患遺伝子の存在部位を推定する方法である。統合失調症は全ゲノムを対象とした連鎖解析が最も多く行われた疾患の一つであり、これまでに有力な候補領域として挙げられている染色体領域は1q, 2q, 3p, 5q, 6p, 6q, 8p, 10p, 11q, 13q, 22q である(Arinami et al., 2005; 有波, 2003)。躁うつ病においては、4p, 11p, 12q, 18p, 21q, Xq が有力であると考えられている(氏家, 2000)。しかし、統合失調症や躁うつ病の連鎖解析において、連鎖領域は多数同定されているものの、不一致な研究結果が多く、疾患感受性遺伝子座について明確な結論が出るには至っていない。その原因として、遺伝的異質性、疾患の診断基準、民族差など様々な問題が指摘されてきた。しかし近年の、全ゲノム解読プロジェクトや国際 HapMap 計画の成果により、ゲノム情報のデータベースの充実やバイオインフォマティクスという新たな分野が発展し、家系によらずとも、患者(**case**)—健常対照者 (**control**) 集団を用いた連鎖解析が可能となり、連鎖不平衡 (**Linkage disequilibrium: LD** 後述)を手がかりに、位置的候補遺伝子として疾患感受性遺伝子を取り上げる方法が行われるようになってきた。

後者の機能的候補遺伝子法とは、主に精神薬理学的観点から機能的候補を予測し、患者—健常対照群間比較関連解析 (**case-control association study**) の手法によって疾患感受性遺伝子であるかどうか検討する方法である。この患者—健常対照群間比較関連解析とは、多型性を示す遺伝マーカーにおいて、対立遺伝子頻度分布に患者群と健常対照群間で偏りがあるか否かを検定し、疾患とその多型、もしくは近傍の遺伝子との関連の有無を調べる方法である (参照: 対象と方法 2-4 単点 **SNP** 関連解析)。近年では、単一塩基多型 (**single nucleotide polymorphism ; SNP**) をマーカーとした関連解析が盛んに行われるようになってきた。SNP とは、ゲノムワイドに最も多く分布する遺伝子多型マーカーであり、数百塩基に1個程度の頻度で存在する。2塩基の繰り返し

多型であるマイクロサテライトマーカーなどと比べると、多型情報量は多くはないが、全ゲノムにわたり莫大な数が存在し、また、アッセイ法が簡単で大量のサンプルを高速に処理するために必須である機械化、自動化に適したマーカーである。これまでの精神疾患における膨大な関連解析の報告から、例えば Ser311Cys (DRD2)、Ser9Gly (DRD3)、102T/C (HTR2A)、Val108/158Met (COMT)、Val199Met (BDNF)などの機能性精神疾患と関連が示唆されているアミノ酸置換を伴う SNP が見つかったが、一部有意な報告はあっても矛盾する報告もあるのが現状である。すでに知られている向精神薬の標的分子については、ほぼ解析が終了しているとはいえ、新たな病態仮説や脳神経科学の知見を用いたさらなる候補遺伝子の着目が必要であると思われる。

連鎖不平衡 (LD) とは、2つ以上の異なる遺伝子座間のアレルの分配が独立でない現象を言う。1人の祖先に突然変異が生じ、それが世代を経て集団内に広まる時、その変異から遠く離れていけば、組み換えによりそれぞれ独立に遺伝する可能性が高いが、近距離に存在し、変異との間で組み換えが起こらず連鎖不平衡の関係にあるものは、その変異と一緒に受け継がれることになる (参照: 対象と方法 2-5 連鎖不平衡解析)。この場合、複数の遺伝子座におけるアレルの組み合わせであるハプロタイプの頻度は、期待される頻度からずれて観察される。ある連鎖不平衡が見られる領域のかたまりは連鎖不平衡ブロックと呼ばれ、組み換えが起こりやすいホットスポットで区切られている。連鎖不平衡の大きさは歴史的背景の違う民族では異なり、北欧系米国人集団での典型的な連鎖不平衡の大きさは 60 kb であったのに対し、ナイジェリア人集団では明らかに小さいと報告されている (Reich et al., 2001)。精神疾患などの common disease (ありふれた疾患) で、遺伝的要因の存在が考えられる場合は、その原因突然変異は家系が異なっても共通のものが多くであろうという common disease common variant (CDCV) 仮説が考えられている (Chakravarti, 1999; Reich and Lander, 2001)。この仮説に従い、common variant が共通祖先の突然変異であると仮定すれば、疾患の変異と周囲の変異に強い連鎖不平衡が存在していることを利用して、疾患遺伝子座を探し出すことができると予想される。すなわち、患者集団とコントロール集団でハプロタイプ頻度を調べれば、原因遺伝子座の周辺で大きな差異が存在すると予測され、患者集団に限って出現頻度が高いハプロタイプが、原因突然変異が起きた時の祖先ハプロタイプであると考えられる (参照: 対象と方法 2-6 ハプロタイプ解析)。

近年、全ゲノム連鎖解析から出発し、連鎖が見られた領域や遺伝子内の SNP 同定、大量のサンプルを用いた関連解析、およびそれら SNPs の組み合わせを用いた連鎖不平衡、ハプロタイプ解析を行うことによって、原因遺伝子を同定するという新しい戦略による大規模研究が現実に行われるようになった。その結果、複数の研究グループから検出された共通する原因候補領域や、メタアナリシスで連鎖が確認された領域から疾患感受性ホットスポットとも言うべき領域が見つかった。例えば統合失調症や躁うつ病の疾患感受性遺伝子の候補として、*dysbindin*、*G72/G30*、*neuregulin* などが同定された (Detera-Wadleigh and McMahon, 2006; Farmer et al., 2007; Li et al., 2006; Li

and He, 2007)。さらに 2008 年には、統合失調症や躁うつ病の大規模サンプルにおける、全ゲノムを対象とした莫大な数(5~100 万個)の SNP タイピングによる全ゲノム関連解析 (genome-wide association study; GWAS) の報告が相次いだ。それによると、統合失調症の場合、12 番染色体にある *CCDC60* (Chr:12q24.23, Coiled-coil domain containing 60) や 3 番染色体にある *RBP1* (Chr: 3q23, Cellular retinol-binding protein)(Kirov et al., 2008)、2 番染色体にある *ZNF804F* (Chr:2q32.1, Zinc finger family 804F)(O'Donovan et al., 2008)などが候補に挙がっており、躁うつ病の場合、10 番染色体にある *ANK3* (Chr:10q21, *ankyrin G*)、12 番染色体にある *CACNA1C* (Chr: 12p13.3, alpha 1C subunit of the L-type voltage-gated calcium channel)や 15q14 領域が疾患感受性遺伝子・領域として注目されている(Ferreira et al., 2008)。

3. 精神疾患の分子病態

これら精神疾患について、先述の分子遺伝学的アプローチ以外にも分子生物学的、病理学的研究も盛んに行われている。そうしたアプローチからこれまでに以下のことが明らかとなってきた。

統合失調症の場合、その中核症状である認知障害は、前頭前野の機能異常をもたらす神経回路の変化に基づくという考え方が有力である。実際に、fMRI を用いた脳画像研究により、統合失調症患者において前頭前野の機能低下が観測され(Barch et al., 2003; Weinberger et al., 1986)、また前頭前野の灰白質体積の減少も報告されている(Hirayasu et al., 2001)。それに寄与している可能性がある現象として、前頭前野 3 層の錐体細胞の基底樹状突起の長さやスパイン密度の減少が報告されている(Glantz and Lewis, 2000; Pierri et al., 2001)。これらの形態学的変化は、統合失調症における前頭前野内の錐体細胞間および、前頭前野錐体細胞と他の皮質領域の錐体細胞との間の神経結合シナプスの減少を示唆している。さらに、シナプス可塑性にも影響をおよぼしていることが考えられる。

一方、単極性うつ病や躁うつ病に関しても、これまでの薬理的、生理学的研究により、様々な病態が明らかとなってきた。単極性うつ病の場合、その病態には、セロトニン系、視床下部-下垂体-副腎皮質 (HPA) 系、脳由来神経栄養因子 (BDNF) の関与などが示唆されており、モノアミンであるセロトニンの不足、海馬グルココルチコイド受容体機能の低下による HPA 系のネガティブフィードバック障害および BDNF の減少が見られる。他にも、単極性うつ病患者の MRI 脳画像では、前頭葉や側頭葉および海馬の萎縮がみられ(Bremner et al., 2000; Duman et al., 2001; MacQueen et al., 2003; Sheline et al., 1999)、これはストレスによる神経細胞新生の阻害や、神経細胞の樹状突起の萎縮が原因と考えられている。躁うつ病は、2 つの真逆の病相が現われることから非常に複雑な疾患であり、モデル動物も確立していないことから分子生物学的研究はあまり進んでいないのが現状である。MRI 画像による脳画像研究でも、躁

うつ病患者と健常対照者の間で、脳全体の体積や、白質および灰白質の体積について有意な差はないという報告もあれば(McDonald et al., 2004)、両側帯状回や傍辺縁系皮質において灰白質の増加が見られたという報告もあり(Bearden et al., 2007)、一致した知見は少ない。しかし、躁うつ病に対して処方される気分安定薬（リチウム、バルプロ酸、カルバマゼピン）が持つ共通の効果として、神経保護・神経新生効果が言われており(Bauer et al., 2003; Hao et al., 2004; Manji et al., 2000)、躁うつ病の病態として神経細胞死の異常が注目されている。さらにその他の気分安定薬の作用として、神経細胞の成長円錐を増大させること(Williams et al., 2002)、神経細胞においてシグナル伝達効率の増強を調節する経路に作用すること(D'Sa and Duman, 2002)、電気生理学的研究により、リチウムやバルプロ酸がシグナル伝達効率の長期増強（LTP）を誘導すること(Rinaldi et al., 2007; Shim et al., 2007)などの効果があることから、躁うつ病の病態にシナプス可塑性の異常が関与している可能性も指摘されるようになった。

4. 中間表現型（Endophenotype）と精神疾患

遺伝医学研究では、遺伝子と表現型との関係を遺伝統計学的に検討した上で、生物学的検討を行い、疾患発症原因となる因子を特定していく。精神疾患は、多くの脆弱遺伝子が複雑に関与する多因子疾患であり、これまでに集団遺伝学的な連鎖解析や関連解析により様々な原因候補遺伝子が報告されてきた。しかし、これらの結果が人種や集団によって異なることが多く、解析対象の母集団によって遺伝子多型の頻度や環境要因が異なること等が原因と考えられている。また、遺伝統計学的検討後、病態モデル動物を用いた研究が必須であるが、精神症候学的な診断を元にしたモデル動物の作製には限界がある。そこで近年、遺伝医学研究に用いられる表現型として、人種などの影響を余り受けず、統一性の高い中間表現型（endophenotype: エンドフェノタイプ）の導入が注目されている。エンドフェノタイプとは、目に見える症候ではなく、微視的でかつ内向な生物学的基盤に近い表現型であり、理想的には①精神障害と関連している、②遺伝性である、③精神障害の状態像に無関係、④家系内では精神障害と共分離する、⑤家族内の非罹患者も一般人口より高率で有する、という基準を満たすものと考えられている。一つのエンドフェノタイプを規定する遺伝子数は、精神障害全体を規定する遺伝子数よりも少数である、つまり、一遺伝子が寄与する割合がエンドフェノタイプの場合、精神障害全体よりも高いと考えられるため、対象とするサンプルサイズが小さくても検出可能である。よって、このエンドフェノタイプを表現型として用いれば、効率よく、より信憑性が高い原因候補遺伝子を同定することが可能であると考えられる。さらには、その後の細胞や動物モデルを用いた生物学的検討にも応用でき、疾患の発症や病態メカニズムの解明につながることを期待できる。

これまでに候補として挙げられている機能性精神疾患（統合失調症・うつ病・躁うつ病）のエンドフェノタイプとしては、神経生理学、生化学、内分泌学、認知機能な

どの神経心理学検査、神経画像などのデータがあげられるが、これまでに上記の基準が満たされていると考えられているものに、MRI 所見、事象関連電位(P50)、プレパルスインヒビション (PPI)、眼球運動、前頭葉の賦活低下、視床下部-下垂体-副腎系 (HPA 系) の異常、血液細胞における Ca^{2+} 濃度の異常などがある(Arolt et al., 1996; Geyer et al., 2002; Lenox et al., 2002; Leonard et al., 2002; Marcelis et al., 2003)。また、神経心理学的なエンドフェノタイプとして、実行機能の低下、陳述記憶・ワーキングメモリの障害、注意の障害などがあげられる(Cannon et al., 2000; Conklin et al., 2000; Glahn et al., 2004; Glahn et al., 2003; Sitskoorn et al., 2004)。

近年では、機能性精神疾患のエンドフェノタイプの一つである認知機能の障害の程度こそが、社会的機能や予後に強く関係することから、機能性精神疾患の中核症状を認知機能障害と考える傾向がある。よって、認知機能の障害をエンドフェノタイプとして遺伝医学的に検討することは、より信憑性の高い原因遺伝子を特定することができ、さらには新規治療法の開発につながるものと期待できる。

5. シナプス可塑性と *neuropsin (NP)* 遺伝子

シナプス可塑性とは、神経活動頻度や他のシナプスとの相互作用によってシナプス伝達効率が可塑的に変化する性質のことを言い、記憶・学習の基礎過程と考えられている。そして、このシナプス可塑性には伝達物質の放出確率の変化や受容体の修飾等にはとどまらず、シナプスの数やその構造の変化などといった形態的な変化を伴うことが明らかとなってきた(Andersen and Soleng, 1998; Fifkova, 1985; Ostroff et al., 2002; Yuste and Bonhoeffer, 2001)。

当研究室でマウス海馬より同定した *Neuropsin (NP)* 遺伝子は、*Kallikrein-related peptidase (KLK) family* に属する細胞外セリンプロテアーゼであり別名 *Kallikrein 8 (klk8)* 遺伝子とも呼ばれる。In situ hybridization 法により、NP mRNA は脳内では主に海馬や扁桃体といった大脳辺縁系や、前頭前野の皮質に発現していることが明らかとなった(Chen et al., 1995; Suzuki et al., 1995)。NP は神経活動依存的に細胞外で活性化され(Shimizu et al., 1998)、プレシナプス特異的に存在する細胞接着分子 *L1cam* を切断し、細胞外環境の調節に関わっていることが示唆されている(Matsumoto-Miyai et al., 2003)。また、電気生理学的手法による活性型リコンビナント NP を用いた実験から、海馬 CA3-CA1 間の Schaffer-collateral における神経伝達を低濃度では増強(long-term potentiation: LTP)、高濃度では抑制(long-term depression: LTD)するといったように濃度依存的にシナプス可塑性を制御していることが明らかとなった(Komai et al., 2000)。そして、近年我々は、NP が単に 1 個のシナプスにおいて長期増強に関与しているだけでなく、時間的・空間的に離れた別のシナプスにおいても LTP を調節していることが明らかとなった。つまり、弱い新たな刺激であっても、強い刺激によって既に成立している LTP シナプスと 30 分以内であれば連関 LTP を成立させることができる可能性

が明らかとなった。このことは、NP が 1 個のニューロンに終止するシナプス間を連立、統合させるという高度な調節を行っている可能性を示唆している(Ishikawa et al., 2008)。組織、分子レベルだけでなく、NP 欠損マウスを用いた各種行動実験から、NP 欠損マウスでは、空間記憶力や社会性行動が有意に低下しており、不安に対する感受性の上昇も見られた(Horii et al., 2008; Tamura et al., 2006)。以上のことから、NP は細胞外環境からシナプスの構造的変化を促進することで神経ネットワークの再編成や機能的シナプス可塑性を調節していると考えられ、記憶や学習、あるいは不安というような情動など脳の高次機能に重要な役割を担っている可能性が示唆されている。

一方、ヒトにおいても、このマウス NP と高い相同性をもつヒト NP (human neuropsin: *hNP*) 遺伝子が見つかっている(Yoshida et al., 1998)。*hNP* 遺伝子は 19 番染色体 19q13.3-4 に局在している(Gan et al., 2000; Harvey et al., 2000)。ヒト 19 番染色体は、2004 年 J Grimwood たちにより全配列が解読され、ヒト染色体の中で最も遺伝子密度が高く、全ゲノム平均の 2 倍を上回ることや、DNA 反復配列が多いことなどが明らかとなり、生物学的な進化の面からも非常に重要と考えられている。また、19q13 領域は、アルツハイマー病、筋緊張性ジストロフィー、パーキンソン病などの神経変性疾患に関係するといわれており、他にも、インスリン抵抗性糖尿病や家族性高コレステロール血症などの遺伝性疾患に関係するとされる遺伝子が多数含まれている(Grimwood et al., 2004)。さらに 19q13 領域は躁うつ病の家系を用いた連鎖解析において有意な関連が認められたという報告もある(Badenhop et al., 2002)。

hNP 遺伝子には 4 つの splice variants が確認されており、それぞれ Type 1、Type 2、Type 3、Type 4 と命名された(Magklara et al., 2001; Mitsui et al., 1999)。*hNP* Type 2 は Type 1 より exon 3 上流が 135bp 長くなっており、その他の構造は Type 1 と 100% 相同である。Type 3、Type 4、はそれぞれ exon 3, 4、exon 3, 4, 5 が欠失しており、プロテアーゼ機能は持たない不活性型と考えられている。*hNP* Type 1、Type 2 は、どちらもヒトの海馬や前頭葉での発現が確認されており、Type 2 に関しては成人の脳に特異的に発現している可能性がこれまでに報告されている(Mitsui et al., 1999)。また、霊長類遺伝子の比較解析から、*hNP* Type 2 のホモログは、テナガザル属以上の高等類人猿であるオランウータン、ゴリラ、チンパンジーにのみゲノム配列が存在していることが明らかとなった(Li et al., 2004)。その後、非常に興味深いことに、この Type 2 の翻訳解析研究から Type 2 はヒトでのみ正常に発現することが明らかとなった(Lu et al., 2007)。このことから Type 2 を含む *hNP* は複雑で高度な脳への進化・発達を考える上で重要な分子である可能性が示唆されている。

以上、マウス NP がシナプス可塑性や記憶・学習などに重要な因子であること、ヒトゲノム解析研究から 19q13 にある *hNP* 遺伝子が精神疾患の原因候補領域にあること、さらには脳高次機能の進化・発達を考える上で重要な因子であることから、*hNP* 遺伝子は、中枢神経の異常により認知など脳の高次機能に障害が見られる精神疾患の発病危険性を規定する重要候補遺伝子であると考えられる。

本研究第 1 章の目的

ヒト特有の高次脳機能獲得に重要な遺伝子であり、シナプス可塑性への関与が示唆されている *hNP* 遺伝子は、認知や情動といった高次脳機能に障害が見られる精神疾患の新たな機能的候補遺伝子となり得ると考えられる。しかし、これまで *hNP* 遺伝子と精神疾患との関係について研究した報告はない。本研究では、*hNP* 遺伝子と精神疾患との関係を明らかにすることを目的とし、遺伝統計学および神経心理学的手法を用いて検討した。第 1 章：1-1 では、SNPs を用いた患者—健常対照群間関連解析および SNPs の機能解析により検討し、第 1 章：1-2 では、精神疾患のエンドフェノタイプでもある認知機能との関連を共分散分析法により検討した。

第1章 1-1 :

Human neuropsin遺伝子多型と精神疾患との関連解析

および関連SNPsの機能解析

目的

本研究第1章：1-1は、基礎的脳科学研究の成果により同定された *hNP* 遺伝子を精神疾患の疾患感受性候補遺伝子とし、近年目覚ましく発展した遺伝医学的解析手法を用いて、*hNP* 遺伝子多型が、統合失調症、単極性うつ病、躁うつ病という機能性精神疾患の発症または病態に関係するか否かを明らかにすることを目的とし、*hNP* 遺伝子の SNPs をマーカーとした患者-健常対照群間比較関連解析を行った。

対象と方法

1. 対象 (Subjects)

対象は、統合失調症患者 439 人、単極性うつ病患者 409 人、躁うつ病患者 207 人および過去に精神科受診歴がなく、精神疾患と心身症等の類似疾患の既往および家族歴のない健常対照者 727 人のゲノム DNA を用いた。

患者に対する診断は、国際診断基準である Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder (DSM-IV; American Psychiatric Association 1994)に基づき、少なくとも2人以上の精神科医によって行われた。

対象となる患者 (case)、健常対照者 (control) は、いずれも事前に精神科医師または臨床心理士等から研究目的や参加する研究内容について口頭および書面での説明を受けており、自発的意志のもと研究に対する参加を表明され、書面で同意が得られている。

尚、本研究は、国立精神・神経センターにおける倫理委員会の審査および承認のもと行った。検体は、いずれも匿名化されており、実験をする上で試料提供者の個人情報に触れることはなかった。

2. 患者-健常対照群間比較関連解析 (case-control association study)

2-1 SNPs 検索

hNP 遺伝子の構造を調べるため、NIH より公開されている NCBI (National Center Biotechnology and Information)データベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) から得たマウス NP の mRNA 情報を元に、University of California at Santa Cruz (UCSC) Genome Bioinformatics ホームページ(<http://genome.ucsc.edu/>)上の Human Blat Search (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>)を利用して、*hNP* のゲノム情報を得た。この情報

を元に、*hNP* 遺伝子のエクソン・イントロン構造を決定し、ダイレクトシーケンス法により SNPs 検索を行った。

ダイレクトシーケンス法とは、PCR 法にて増幅させた DNA 断片の塩基配列を、プラスミドによるサブクローニングの手法を経ず、シーケンス法で確認するというものであり、ハプロイドゲノムの塩基配列を直接解読することにより、ヘテロ型の遺伝子変異を検出することができる。

2-1-1 PCR (Polymerase chain reaction) 法

ダイレクトシーケンスを行うための鋳型 DNA の増幅を PCR 法にて行った。実験に用いた primer は Primer3 プログラム

(http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) にて設計した。

使用した primer 配列の一覧および各領域の primer 組み合わせを表 1 に示す。

以下の実験は、全て 8 連 PCR チューブ (ビーエム機器株式会社) を用いて行った。

反応液組成

AmpliTaq Gold DNA polymerase(5U/ul)	0.2 μ l
10 \times PCR Gold buffer contains no MgCl ₂	2.0 μ l
dNTP Mix(8mM)	0.5 μ l
25 mM MgCl ₂ Solution	1.2 μ l
Primer (10 uM)	各 1 μ l
Template genome DNA(5ng/ul)	2.0 μ l
Autoclaved distilled water(DW)	12.1 μ l
Total	20 μ l

PCR 反応条件は以下の通り :

変性	94°C	30 秒	
アニーリング	60°C	30 秒	
伸長	72°C	1 分	を 40 cycles

2-1-2 Exo-SAP 処理

PCR 産物から未反応の塩基を取り除くために、酵素反応による精製 (Exo-SAP 処理) を行った。

Exo-SAP 処理とは、Exonuclease I (Exo) により PCR 産物中の過剰なプライマーなどの一本鎖 DNA を特異的に消化し、Shrimp alkaline phosphatase (SAP) により PCR 溶液中に含まれる未反応 dNTPs のリン酸基を除去して dNTPs を不活性化する一連の反応のことである。

実際の処理は、PCR Product Pre-Sequencing kit (USB corporation) の指示書に従って行った。

反応液組成

PCR 産物 (25-100 fmol)	x μ l
DW	(8-1.5x) / 2.5 μ l
2.5 \times (PCR Gold buffer/MgCl ₂)	(7-x) / 2.5 μ l
Exonuclease I (10U/ μ l)	0.5 μ l
Shrimp alkaline phosphatase(2U/ μ l)	0.5 μ l
<hr/>	
Total	7.0 μ l

この混合液を 37°C, 60 分→80°C, 15 分で処理した。

2-1-3 サイクルシーケンス法

シーケンス反応は、ダイターミネーターを用いたサイクルシーケンス法にて行った。実際の実験には、CEQ: Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start kit (BECKMAN COULTER)の指示書に従った。

サイクルシーケンス反応の PCR 条件は以下の通り

反応液組成

Exo-SAP 処理 PCR 産物	7 μ l
1.6 μ M primer	2 μ l
DW	3 μ l
2.5 \times (PCR buffer/MgCl ₂)	4 μ l
DTCS mix	4 μ l
<hr/>	
Total	20 μ l

シーケンスが困難な配列の場合、上記反応液にベタイン (最終濃度 1M) を加えた。

PCR 反応条件は以下の通り :

96°C	20 秒、	
50°C	20 秒、	
60°C	4 分	を 40 cycles

反応産物に反応停止液を加え、エタノール沈殿による精製をした。

反応停止液組成

3M NaOAc	2 μ l
100mM EDTA	2 μ l
20mg/ml Glycogen	1 μ l
<hr/>	
Total	5 μ l

- 1) Stop solution 5 μ l を反応産物 20 μ l に加えた。
- 2) 3 倍量の冷却 100%エタノールを加えて混合した。
- 3) -20°Cで 10 分放置した。
- 4) 遠心分離。Cfg.1400g、4°C、30 分。
- 5) 上清を捨て、室温 70%エタノールによるリンスを Cfg.1400g、4°C、10 分にて 2 回行った。

6) ペレットを真空乾燥させ、Sample Loading Solution (SLS) 35 μ l に溶解した。

CEQ 8000 専用アッセイプレートに分注し、シーケンサー: CEQ 8000 Genetic Analysis system (BECKMAN) にて解析を行った。

得られた塩基配列を、

Multialin (<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html>) を用いて alignment し、目視により確認し、SNPs 同定を行った (図 1)。

2-2 制限酵素断片長多型 (RFLP) 解析

Exon6 内の SNP22 の確認のため、RFLP 解析を行った。

hNP exon 6 増幅用 primer (primer name 25)用いて、PCR 法による増幅を行った。PCR 反応条件等は上述の通り。

制限酵素反応: 制限酵素は *Acy* I (12unit/ μ l) を用いた。

PCR product	5 μ l
添付反応バッファー 10 \times B buffer:	1 μ l
<i>Acy</i> I	0.02 μ l
DW	3.98 μ l
<hr/>	
Total	10 μ l

反応条件: 50 $^{\circ}$ C, 60 分処理。

続いて、10%ポリアクリルアミドゲルにて泳動を行った。

10%ポリアクリルアミドゲル組成

30% Acrylamide-Bis (29:1) (SERVA)	3 ml
10 \times TBE	0.9 ml
10% APS	45 μ l
DW	5050.5 μ l
TEMED	4.5 μ l

酵素処理産物 10 μ l をゲルにアプライし 100V、4 時間、4 $^{\circ}$ C で泳動した。その後エチジウムブロマイドによる染色を行いバンドの長さを確認した。

Acy I は正常アレルを認識し切断する。この変異を有する個人においては、未切断の 388bp の DNA バンドが 1 本、切断された 200bp と 188bp のバンド 2 本が確認できる。この変異を有しないその他の検体では、切断された 200bp と 188bp のバンド 2 本のみが確認できる。

2-3 SNP genotyping

各 SNP における遺伝子型の判定は、蛍光標識したアレル特異的オリゴヌクレオチドを用いた TaqManPCR 法にて行った。

TaqManPCR 法の原理:

各アレルに相補するプローブ約 20 塩基には、5'末端に FAM や VIC などの蛍光物質

(レポーター)、3'側に消光物質 (クエンチャー) が標識されており、通常状態ではレポーターの蛍光はクエンチャーによって抑えられている。PCR 反応液中にこのプローブを混ぜ PCR 反応させると、まず TaqMan プローブがターゲットにハイブリダイゼーションする。同時に PCR プライマーから伸長が起こる。伸長反応が進む際に Taq ポリメラーゼの 5'ヌクレアーゼ活性により TaqMan プローブのレポーターが切断される。すると、レポーターがクエンチャーの影響を受けなくなるため蛍光を検出できるようになる。その後、蛍光検出器にて FAM、VIC の蛍光強度を測定することによって対象サンプルのタイピングを行うことができる。

実際の実験は、ABI の TaqMan SNP Genotyping Assays (Custom, small-scale) のプロトコールに従った。

各 SNP に用いた probe は以下のものである。

SNP3: probe1 5'-VIC-CTCGGTCAGACCTAAA-3'
 probe2 5'-FAM-TCGGTCAGGCCTAAA-3'

SNP4: probe1 5'-VIC-TTTCAGATCGTAGAGTCT-3'
 probe2 5'-FAM-TTTCAGATCCTAGAGTCT-3'

SNP6: probe1 5'-VIC-CCCCGAGTACTCC-3'
 probe2 5'-FAM-CCCCGTGTACTCC-3'

SNP7: probe1 5'-VIC-AACTATCCCCACCATTAC-3'
 probe2 5'-FAM-CTATCCCCGCCATTAC-3'

SNP23: probe1 5'-VIC-CTGGCAGACTAGGTG-3'
 probe2 5'-FAM-TGGCAGGCTAGGTG-3'

384well plate (ABI)にゲノム DNA を 1ng/well ずつ分注し、乾燥保存しておいた。

以下の組成の反応液を加え、PCR 反応を行った。

TaqMan Universal PCR Mastermix(Applied Biosystem)	2.5 μ l
probe assay mix (final 100 nM)	0.0625 μ l
DW	2.4375 μ l
Total	5 μl

PCR 反応条件 :

95°C, 10 分	
92°C, 15 秒	
60°C, 1 分	50 cycles
4°C, ∞	

ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System and SDS Enterprise Database にて解析を行い、遺伝子型を決定した (図 2)。

2-4 単点SNP関連解析 (Single SNP association study)

多因子疾患における疾患感受性遺伝子の同定に適した研究方法として、候補遺伝子

を用いた患者－健常対照群比較関連解析研究がある。この方法は、ある集団中から多数の case（患者）と control（健常対照者）とをサンプリングし、疾患の候補遺伝子を設定して、着目する多型の対立遺伝子の頻度を患者群と健常対照群間で比較し、頻度に有意な差があるか否かを統計学的手法を用いて検定する方法である（下記 S1 参照）。

関連解析に先立ち、用いたサンプル集団が任意交配のもと成り立っていることを確認するため、ヘテロ接合体の頻度の観察値が Hardy-Weinberg の平衡法則（ハーディ・ワインベルクの平衡法則：下記 S2 参照）から期待される理論分布値を満たしているかどうか χ^2 適合度検定により確認した。続いて、患者－健常対照群間で各 SNPs における遺伝子型頻度（Genotype frequency）や対立遺伝子頻度（Allele frequency）の比較を、 2×2 、 2×3 の χ^2 独立性の検定にて行った。また、リスクアレルを持つ人が、それを持たない場合と比較して、どの程度罹患しやすいかを数値化した発症リスクオッズ比（odds ratio）を算出した。さらに、有意差が見られた SNP のリスクアレルの疾患への影響を検討するため、遺伝子型相対リスク（優性、劣性遺伝モデル）を算出した。遺伝子型相対リスクは、ヘテロ接合体を、優性モデルあるいは劣性モデルに当てはめ、 2×2 の分割表を用いて検定を行った。これら統計値の算出には SPSS software 11.0J (SPSS Japan Inc.)を用いた。

<S1、患者－健常対照群比較関連解析研究>

患者－健常対照群間で、対立遺伝子頻度分布を比較

健常対照群	患者群
-A-G-G-C-G	-A-G-G-C-G
-A-G-A-C-G	-A-G-A-C-G
-A-G-G-C-G	-A-G-G-C-G
-A-G-G-C-G	-A-G-A-C-G
-A-G-G-C-G	-A-G-A-C-G

SNP: G/A

この場合、健常対照群より患者群では A が多く出現しており、このことが疾患発症と関係している可能性が示唆される。

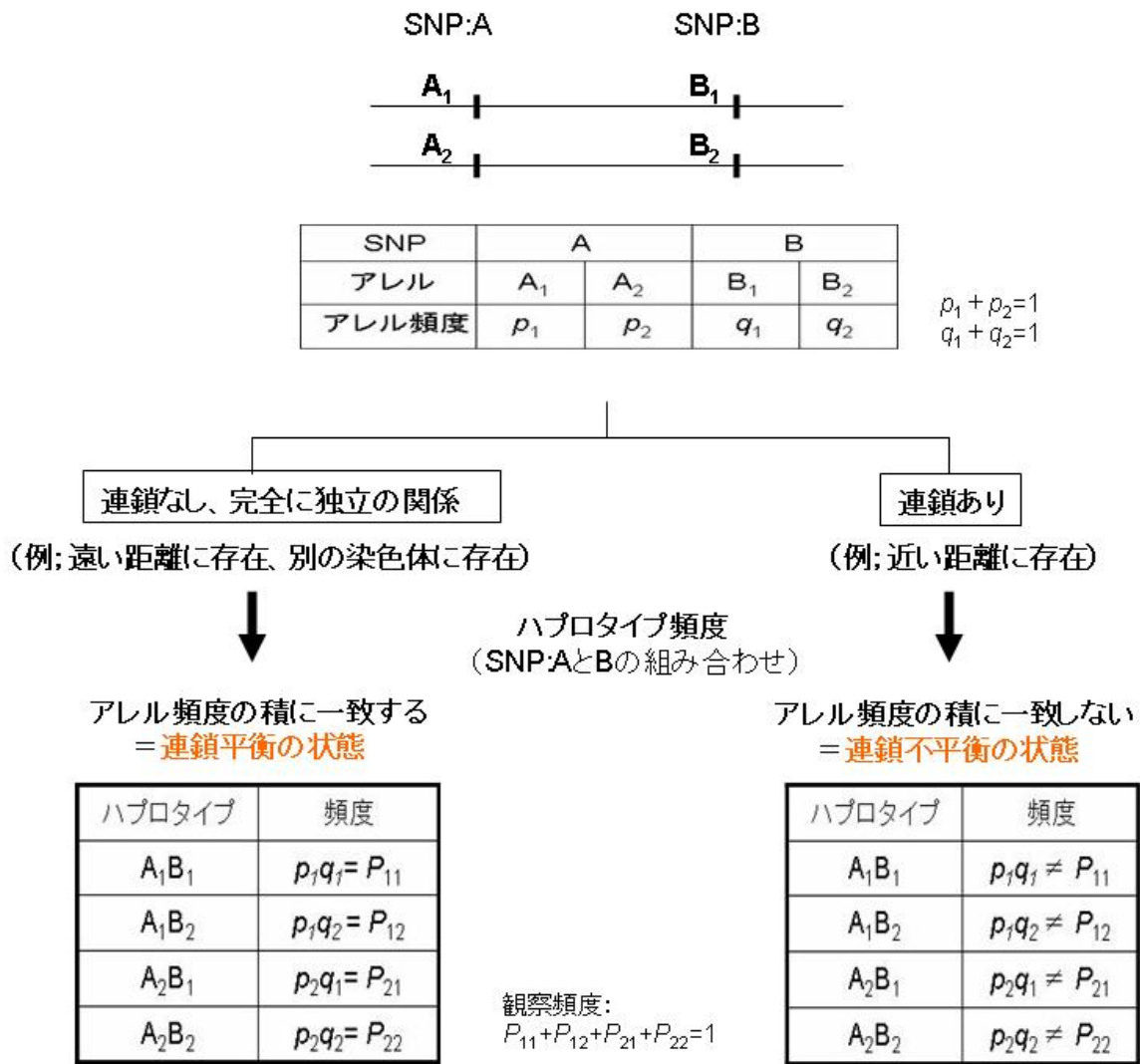
<S2、ハーディ・ワインベルクの平衡法則>

ある SNP の 2 つの対立遺伝子 A_1 と A_2 を考える。それぞれの遺伝子頻度を p および q とする ($p + q = 1$)。この座位について、任意交配が成立していれば、次世代では 3 種類の遺伝子型の分布について下の表の関係が成り立つ。この関係は、任意交配が続く限り、いく世代重ねても続いていく。この法則をハーディ・ワインベルクの平衡法則という。

遺伝子型	頻度
A_1A_1	p^2
A_1A_2	$2pq$
A_2A_2	q^2

2-5 連鎖不平衡解析

連鎖不平衡 (Linkage Disequilibrium: LD) とは、2 つ以上の遺伝子座間のアレルの非独立状態を指し、観察されるハプロタイプ頻度が各遺伝子座における対立遺伝子の頻度を掛け合わせて得られる頻度からずれている現象のことをいう。例えば、2 つの SNP について考えてみた場合、この 2 つが全く独立で、連鎖していないとすると、2 つの SNP から得られる組み合わせ遺伝子型 (ハプロタイプ) はその遺伝子多型の積に一致する。一方、連鎖している場合は、ハプロタイプ頻度は 2 つのアレル頻度の積より大きくなる (下記図参照)。



例えば、A₁ と B₁ の連鎖が強ければ観察値のハプロタイプ頻度は、 $P_{11} > p_1q_1$ となる。このときの P_{11} と p_1q_1 の値の差が連鎖不平衡係数 (D) となる。この D 値は、遺伝子多型頻度や引き算の向きに影響されるので補正が必要であり、2 種類のパラメーター、 D' と r^2 で示される。 D' は組み替えの歴史を示し、 r^2 は変異の成り立ちを反映する。

連鎖不平衡係数 (D' , r^2)

$$D = P_{11} - p_1 q_1$$

$$D' = D/D_{max}$$

$$(D_{max} = \min[p_1 q_2, p_2 q_1])$$

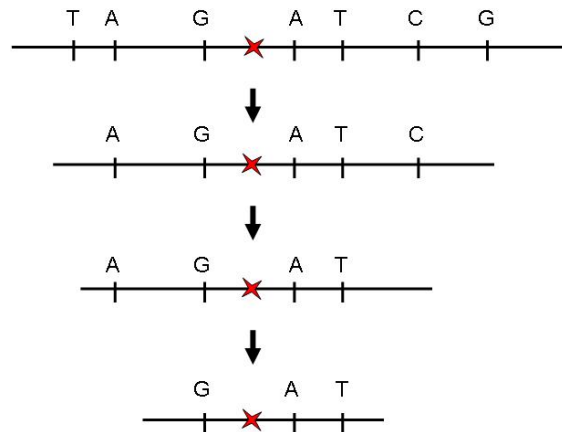
$$r^2 = D^2 / (p_1 p_2 q_1 q_2)$$

上述の図のように、4つの可能なハプロタイプのうち1つが観察されないとき、多型の頻度に関わらず、 $D'=1$ となる。 D' 値、 r^2 値ともに、1に近いほど連鎖が強いことを意味する。

連鎖不平衡解析では、ハーディ・ワインベルク平衡状態にある集団に属する個体サンプルをもとにして、集団のハプロタイプ頻度および対立遺伝子頻度により連鎖不平衡係数 D' , r^2 を算出し、連鎖不平衡強度を決定する。統合失調症や気分障害のような Common disease では、その原因突然変異は家系が異なっても共通のものが多いであろうという Common disease Common variant : CDCV 仮説に基づき、Common variant が共通祖先の突然変異によると仮定することができる。このことから、疾患の変異と周囲の変異に強い連鎖不平衡が存在していることを利用して、疾患遺伝子座を探し出すことができると予想され、疾患関連部位もしくは、疾患関連遺伝子の発見につながると考えられている（下記 S3 参照）。

連鎖不平衡値の算出および連鎖不平衡ブロックの推定は Haploview program version 3.11 (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>)(Barrett et al., 2005)を用いて、Gabriel et al 2002(Gabriel et al., 2002)を参考に EM アルゴリズムにより行った。

<S3、疾患原因変異とマーカーとの連鎖不平衡>



一人の祖先のある遺伝子に、疾患に直接関与する変異が生じ、それが世代を経て集団内に広がったとする。世代を経るごとに染色体の組み換えにより、変異から離れている SNP は少しずつ失われていくが、変異から近距離に存在する SNP は、変異との間で組み換えが生じる可能性は低く、原因変異と一緒に受け継がれていく。

2-6 ハプロタイプ解析

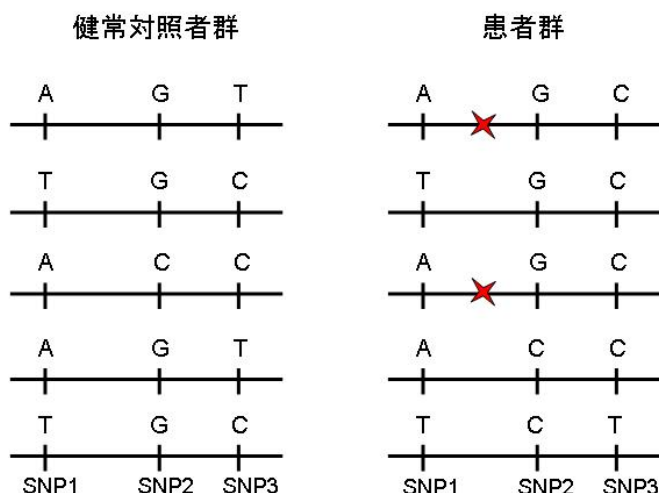
ハプロタイプとは、連鎖する複数の座位の対立遺伝子 (Allele : アレル) の組み合わせ遺伝子型のことである。ゲノム全域を網羅するハプロタイプデータベースの構築も進められている (HapMap 計画)。ハプロタイプ解析は、ある遺伝子、遺伝子座をハプロタイプに分けることで、関連解析に応用する方法であり、連鎖不平衡の強い LD ブロック内では tag-SNP を用いることで、少ないタイピングで疾患関連ハプロタイプの検出、そのハプロタイプ上の責任遺伝子座位の同定が可能である (下記 S4、S5 参照)。患者-健常対照群間において、原因遺伝子座の周辺で大きな差異が存在すると予想され、患者集団に限って出現頻度の高いハプロタイプが、原因突然変異が起きたときの祖先ハプロタイプであると考えられる (上記 S3 参照)。

ハプロタイプ解析における、individual p -value、global p -value の算出には、EM アルゴリズムにより COCAPHASE software version 2.4 (<http://www.mrc-bsu.cam.ac.uk/personal/frank/software/unphased/>)

(Dudbridge et al., 2000) を用いて行った。出現頻度が 3% 未満であるハプロタイプは解析から除外した。また、多重比較の問題、サンプルの偏りの問題を是正するため、permutation test による p -value の繰り返し計算を試行した。なお、繰り返し回数は 10,000 回とした。

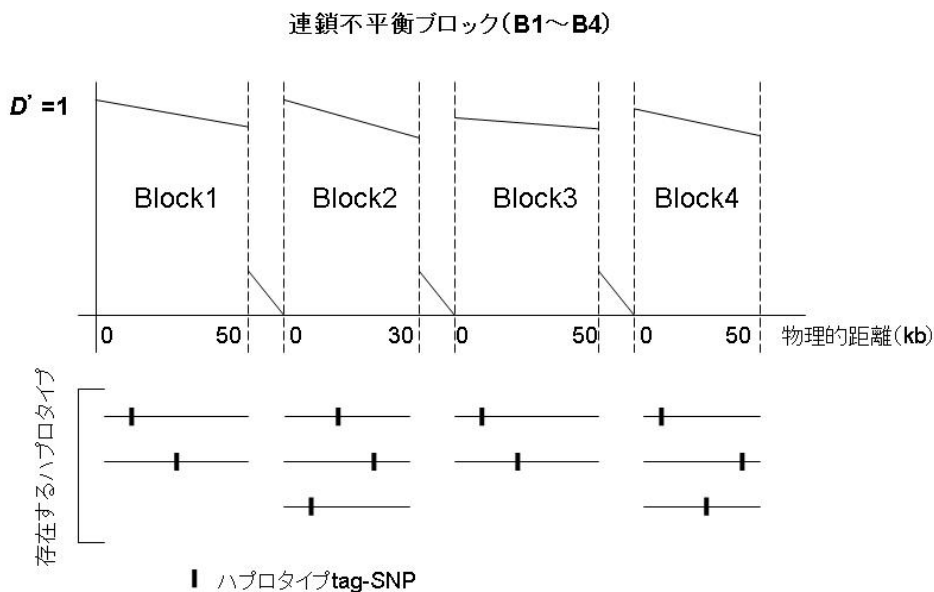
全ての解析において有意水準 p -value 値は、0.05 未満で有意、0.1 未満で有意の示唆とした。

<S4、ハプロタイプ解析の利点>



SNP 1、2、3 は疾患に関与する変異と連鎖不平衡関係にあり、SNP : A-G-C からなるハプロタイプのみが変異を持っているとする。健常対照群と患者群間において、各 SNP の分布に有意な差は得られなかったとしても、ハプロタイプで検討した場合、有意に患者群で出現頻度が高いハプロタイプの存在が明らかとなる。

<S5、連鎖不平衡ブロック、ハプロタイプおよび tag-SNP>



ゲノムには強い連鎖不平衡 (D') が保たれる領域 (LD ブロック) と、途切れる領域 (組み換えホットスポット) が存在する。一般的に LD ブロックは 30~50kb とされ、組み換えにより連鎖不平衡が崩れる。LD ブロック内 (Block1~5) では少ないハプロタイプしか存在せず、tag となる SNP が存在する。

(参考:ゲノム医学における集団遺伝学)

3. 転写調節領域にあるSNPsの機能解析

hNP 遺伝子上流に存在し、疾患との関連が明らかとなった SNPs の転写活性に及ぼす影響を、ラット初代培養ニューロンとヒト Neuroblastoma 培養細胞 (IMR-32) を用いたルシフェラーゼアッセイ法により検証した。

3-1 *hNP* 発現調節領域ゲノムコンストラクト作製

3-1-1 発現調節領域のクローニング

hNP 遺伝子発現領域上流にある各 SNPs (SNP1、SNP2、SNP3、SNP4) が、転写活性に及ぼす影響と *hNP* 遺伝子の転写調節領域を精査するため、含まれる SNPs の数が異なる (SNPs はメジャーアレルで統一させている) *hNP* 遺伝子上流領域を組み入れた 5 種類の DNA コンストラクトを作製した。

5 種類のコンストラクト:

pGL3-964 : (SNP1-2-3-4; G-C-A-G を含む 964bp)、

pGL3-600 : (SNP2-3-4; C-A-G を含む 600bp)、

pGL3-369 : (SNP3-4; A-G を含む 369bp)、
 pGL3-277 : (SNP4; G を含む 277bp)、
 pGL3-128 : (SNP を含まない 128bp)

hNP 遺伝子上流ゲノムは、SNP1、SNP2、SNP3、SNP4 の遺伝子型が全てメジャーアレルのホモ型である人のゲノム DNA から PCR 法にて合成した。

プライマーの 5'端には、*Mlu* I (Forward) 制限酵素サイト、*Bgl* II (Reverse) 制限酵素サイトが付加されており、各 PCR 産物は pGL3-Basic firefly luciferase reporter vector (Promega, Madison, WI, USA)のマルチクローニングサイトへサブクローニングした。

Primers :

pGL3-964 : Forward : 5'-CGACGCGTGCGTGTGCTGGGTTTGAA-3'
 Reverse : 5'-GAAGATCTCTAGAGCCTGGGGAGCTTCT-3'
 pGL3-600 : Forward : 5'-CGACGCGTGATCCCGGACCTCTCAGG-3'
 Reverse : 5'-GAAGATCTCTAGAGCCTGGGGAGCTTCT-3'
 pGL3-369 : Forward : 5'-CGACGCGTAGTCCTGGCCCCTAGCAG-3'
 Reverse : 5'-GAAGATCTCTAGAGCCTGGGGAGCTTCT-3'
 pGL3-277 : Forward : 5'-CGACGCGTCCCTCCTCCCTTAGATTTAGG-3'
 Reverse : 5'-GAAGATCTCTAGAGCCTGGGGAGCTTCT-3'
 pGL3-128 : Forward : 5'-CGACGCGTCCCTCCTCCTAGCCTCAG-3'
 Reverse : 5'-GAAGATCTCTAGAGCCTGGGGAGCTTCT-3'
 (各 Reverse primer は、exon1 の 5'側 26bp を含んでいる。)

PCR 反応液組成 :

PrimeSTAR TM HS DNA Polymerase (2.5 units / μ l) TAKARA	0.2 μ l
5 PrimeSTAR TM Buffer (Mg ²⁺ plus)	4.0 μ l
dNTP mix (2.5 mM each)	1.6 μ l
Primer (2.5 μ M)	各 1.0 μ l
Template genome DNA (5 ng/ μ l)	2.0 μ l
Autoclaved distilled water (DW)	10.2 μ l
Total	20 μ l

PCR 反応条件 :

	98°C	5 分	
変性	98°C	10 秒	
アニーリング	63°C	30 秒	
伸長	72°C	1 分	35 cycles
	72°C	4 分	
	4°C	∞	

サブクローニング後、上述 2-1-3 サイクルシーケンシング法を用いて挿入配列の確認を行った。この際に用いた primer は、

5'-TCTCCATCAAAAACAAAACGAA-3' (Forward)、
5'-TTCCATCTTCCAGCGGATA-3' (Reverse) である。

3-1-2 遺伝子型バリエーションの作製

hNP 遺伝子上流 SNPs において、対立遺伝子間における転写活性の差の有無を検証するため、pGL3-964 のメジャーアレル型 (SNP1-2-3-4; G-C-A-G) とマイナーアレル型 (SNP1-2-3-4; T-T-A-C) を含むコンストラクトを作製した。

メジャーアレル型は、上記のものを使用。

マイナーアレル型は、マイナーアレルをホモで持つ人のゲノム DNA から合成し、上記と同様の primer、手法で作製した。

3-2 生後ラット中枢神経細胞の初代培養法

培養培地：

- L-15medium (Gibco)
- 5-5-DF : 5%HS (非働化馬血清) 5ml (最終濃度 5%)
5%FBS (非働化仔牛血清) 5ml (最終濃度 5%)
D-MEM/F-12 (Invitrogen) 90ml

細胞分散用酵素液 (パパイニン液)：

- 1) DL-Cysteine HCl (Sigma) 2 mg、牛血清アルブミン (インタージュンカンパニー, 31400) 2 mg、グルコース 50 mg を PBS (Sigma) 10ml に溶かし、4°C で保存、使用数分前に室温に戻す。
- 2) 脳を取り出した直後にパパイニン (Worthington 3120) 90 units (約 4~6 mg) と直前に解凍した 1%DNase I 液 (SIGMA) 100 μ l を、室温に戻しておいた 1) に加え使用する。

プレートコーティング用 ポリエチレンイミン：

- Polyethylenimine (Sigma P-3143) 1 ml
- Borate buffer (0.15M, pH8.4) 100 ml

培養方法：

- 生後 2 日後の仔ラット (SLC, Sizuoka, Japan) から、大脳皮質および海馬を取り出し、それぞれメスで細断する。
- L-15 培地入りの遠心管 2 本に各組織を移し、遠心 1100rpm、室温で 2 分行った。沈殿組織に細胞分散酵素液であるパパイニン液 (パパイニン; Worthington 90 units/10ml) 10 ml を各組織に加え、37°C 15 分振盪させた。
- 遠心 1100rpm、室温で 5 分後、沈殿組織に 5-5-DF 培地を加え、先端を切断すること

で穴を大きくさせたチップでピペッティングを行い、細胞を分散させた。

- ・分散させた細胞をフィルター濾過し、遠心 1100rpm、室温で 5 分行い、沈殿させたのち、上清を綺麗に除去した。
- ・24 穴プレート (2 cm²/well; Corning) に、細胞最終濃度が 4 or 5×10⁵/cm²になるよう 5-5-DF 培地を沈殿組織に加え、ピペッティングを行ったあと、各 well に撒いた。
- ・37°C インキュベータで培養した。
- ・撒いてから 5 日後に遺伝子導入を行い、6 日後にルシフェラーゼアッセイを行った。
- ・24 穴プレートは、事前にポリエチレンイミンで表面をコーティングされているものを使用した。

3-3 ヒト Neuroblastoma 細胞の培養法

培養培地：

MEM-E (Sigma M5650)	500 ml
200mM L-glutamine (final 2mM)	5 ml
FBS (非働化仔牛血清)	50 ml
抗生物質ペニシリン&ストレプトマイシン (P&S : Sigma P0781)	5 ml

細胞継代・培養方法：

10cm シャーレにて継代・維持を行った。

- ・培地吸引除去
- ・PBS (Sigma) 5 ml で 1 回洗浄、すぐに吸引除去。
- ・0.05%トリプシン-0.53mM EDTA (Sigma) を 2 ml 添加、37°C インキュベータにて 2~3 分放置し、細胞をプレートから剥がした。
- ・トリプシン反応を停止するため 9 ml の培地を添加した。
- ・自動ピペットにより吸引、排出を繰り返すことで細胞を完全に剥がした。
- ・セルストレイナー(40um メッシュ)を通過させて 50ml 遠心管に回収した。
- ・遠心 800 rpm, 室温, 5 分により細胞を沈殿させた。
- ・上清除去後、
継代の場合、10cm シャーレ 1 枚に 12 ml の細胞懸濁液を継代した。
遺伝子導入させる場合は、24 穴プレート (2 cm²/well; Corning) の各 well に、濃度が 4×10⁵cell/ml に調節してある細胞懸濁液を 1ml 撒いた。
- ・37°C インキュベータで培養した。

24 穴プレートに撒いてから 2 日後、遺伝子導入を行い、導入 48 時間後にルシフェラーゼアッセイを行った。

3-4 遺伝子導入法

LipofectamineTM 2000 reagent (Invitrogen, Tokyo, Japan)を使用し、そのプロトコールに従い行った。しかし、24well プレーートの各 well に導入する DNA 量や Lipofectamine の量は、予備実験を行った結果、通常プロトコール量の 4 倍量にした。

24 穴プレートの各 well に導入させた培地、遺伝子、Lipofectamine :

• Opti-MEM	400 μ l
• pGL3-Basic firefly luciferase reporter vectors (目的ゲノムを含むベクター)	3200 ng
• phRL-TK renilla luciferase vector (標準化用レポーター: Promega, Tokyo, Japan)	100 ng
• Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen, Tokyo, Japan)	6 μ l

遺伝子導入当日に、事前に 24 穴プレート各 well の培地交換を行った (500 μ l)。

3-5 ルシフェラーゼアッセイ法

ラット初代神経細胞の場合、遺伝子導入 24 時間後、ヒト neuroblastoma 培養細胞の場合、48 時間後にアッセイを行った。

方法は、Promega の Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, Tokyo, Japan)のプロトコールに従い行った。

アッセイ組成 :

• 各 well の Cell lysate	10 μ l
• Luciferase Assay Buffer II	50 μ l
• Stop & Glo Buffer	50 μ l

発光測定には、Lumat LB 9507 luminometer (Berthold, Bad Wildbad, Germany)を用いた。データ算出後、ポジティブコントロールである pGL3-SV40 (SV40promoter を有する)の値で標準化し、*t*-検定により平均値の比較を行った。ネガティブコントロールは、何も遺伝子を組み込んでいない pGL3-Basic firefly luciferase reporter vector を用いた。

結果

SNPs検索

hNP 遺伝子が精神疾患の発症脆弱性や病態に影響を与えているかどうか、*hNP* 遺伝子上の多型 SNPs を用いた関連解析、連鎖不平衡解析により検討を行うため、統合失調症患者 24 名のゲノム DNA を用いて、ダイレクトシーケンス法により *hNP* 遺伝子領域の SNPs 検索を行った。

第一段階のスクリーニングは、ヒトでのみ発現していると考えられている *hNP* 遺伝子の splicing valiant Type2 特異的な部位を含む exon3a (regular form である Type1 の exon3 より 5'上流が 135bp 長い) と、exon3a に対して影響を及ぼしうる intron2 領域について行った。その結果、exon3a には SNP が見つからなかったが、intron2 において 1 つの SNP の存在を確認した (図 3: SNP6)。

第二段階のスクリーニングは、プロモーター領域を含むと考えられる転写開始点上流 964bp から、残り全ての exon および intron、そして翻訳領域下流約 650bp までを含む計 7428bp の領域について SNPs 検索を行った。その結果、5'上流に 4 個、exon6 に 1 個、3'下流に 6 個、および intron に 17 個、領域全体において insertion/deletion 多型を含む合計 28 個の SNPs を同定した (図 3: SNP1-28)。

SNP1, 2, 4, 5 の 4 個、SNP8, 9 の 2 個、SNP10, 13 の 2 個、SNP15, 16, 17, 19, 21, 23, 24, 25, 27, 28 の 9 個においては、互いの遺伝子型が一致する完全なる連鎖が認められた。SNP3, 5, 8, 10, 11, 13, 14, 22, 26 は National Center for Biotechnology Information (NCBI) が公開している dbSNP データベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) に未記載の SNPs であり、今回、新規に登録を行った (図 3: ss 番号の 9 SNPs)。

SNP22 (G5047>A) は、exon6 内に位置し、唯一の cSNP (c: cDNA) であり、さらにはアミノ酸置換 (Val286Ile : アミノ酸番号は NP_653088 を参考に記載) を伴うことから、機能的変化が予想される重要な SNP と考えられた。そこで、統合失調症患者 154 人のゲノム DNA において追加検索を行った。その結果、この SNP22 を有するのは最初の 1 名のみであり頻度が少ないため関連解析における変異マーカーとして適さず、続いて行う関連解析では除外した。ただし、この 1 名についてはこの SNP の存在を確認するため、塩基置換部分を認識する制限酵素 *Acy I* を用いた制限酵素断片長多型 (RFLP) 解析を行った。*Acy I* は正常アレルを認識し切断する。RFLP 解析では、SNP22 含有ゲノムにおいて、未切断の 1 本の DNA バンド、切断された 2 本の DNA バンドの計 3 本のバンドが確認できたが、対照者においては切断された 2 本の DNA バンドのみが確認された (図 4)。すなわち、これら追加検索および RFLP 解析の結果により、SNP22 はこの個人特有の新規の突然変異である可能性が示唆された。

以上、SNPs 検索より、*hNP* 遺伝子上に 9 個の新規 SNPs を含む合計 28 個の SNPs を同定し、そのうち SNP22 は新規突然変異である可能性が示唆された。

患者-健常対照群間比較関連解析

1. 単点SNP関連解析 (Single SNP Association study)

互いに完全連鎖している SNPs の中から、exon に近い位置に存在する SNP3、4、6、7、23 の 5 SNPs を選び、統合失調症患者 439 人、単極性うつ病患者 409 人、躁うつ病患者 207 人と健常対照者 727 人において 5 SNPs の遺伝子型を決定した。

疾患-健常対照群間比較に先立ち、ハーディ・ワインベルグ平衡検定を行った。検定の結果、SNP3 において単極性うつ病患者群でのみ、ヘテロ接合体の観察値と期待値との間にずれがあり、有意差が見られたが($p=0.02$)、健常対照者群における SNP3 ではハーディ・ワインベルグ平衡を満たしていた。その他の疾患群における 5SNPs のジェノタイピング結果に関してはいずれもハーディ・ワインベルグ平衡からの逸脱は認められなかった(表 2)。

各 SNPs について患者-健常対照群間での遺伝子型頻度 (Genotype frequency : GF) および対立遺伝子頻度 (Allele frequency : AF) を集計し、 2×3 、 2×2 の χ^2 独立性の検定を行った。その結果、統合失調症-健常対照群間ではいずれの SNPs においても有意な関連性は認められなかった(表 2)。さらに、単極性うつ病-健常対照群間においても、すべての SNPs において有意な差は見られなかった(表 2)。一方、躁うつ病-健常対照群間では、SNP4、SNP7、SNP23 において、遺伝子型頻度 (GF)、対立遺伝子頻度 (AF) どちらにおいても有意な差が得られ (GF ; SNP4 $p=0.023$ 、SNP7 $p=0.042$ 、SNP23 $p=0.0073$ AF ; SNP4 $p=0.019$ 、SNP7 $p=0.018$ 、SNP23 $p=0.0015$) (表 2)、各 SNPs のマイナーアレルが躁うつ病患者で有意に多いことが明らかとなった (表 2 および図 5)。さらに、これら 3SNPs について、マイナーアレルを持つことがどの程度、躁うつ病罹患率を高めるかを知るために、発症オッズ比を算出した。その結果、SNP4、SNP7、SNP23 でのオッズ比はそれぞれ 1.33、1.31、1.48 であった (表 2)。これは、各 SNP においてマイナーアレルを持っている人は、持っていない人に比べて躁うつ病罹患率が約 1.33 倍、1.31 倍、1.48 倍高いことを示している。

次に、どの遺伝子型が危険因子となり得るかの推定を行うため、各アレルを 1 個以上持つ群 (carrier ; 優性モデル) と全く持たない群 (homo ; 劣性モデル) とに分割し、躁うつ病と健常対照集団中における頻度を 2×2 の χ^2 検定により解析した。その結果、メジャーアレルを 1 個以上持つ群 (Major allele-carrier) とマイナーアレルのみ持つ群 (Minor allele-homo) で分けた場合では躁うつ病-健常対照群間において有意な差はなかった。ところが、メジャーアレルのみ持つ群 (Major allele-homo) とマイナーアレルを 1 個以上持つ群 (Minor allele-carrier) で分けた場合においては、SNP4、7、23 のみならず、SNP6 においても、それぞれ SNP4: $p=0.007$ 、SNP6: $p=0.03$ 、SNP7: $p=0.01$ 、

SNP23: $p=0.002$ となる結果が得られた (表 3)。いずれの SNPs についても Minor allele-carrier の頻度が患者群において有意に高く、マイナーアレルを 1 個でも持つこと、すなわちマイナーアレル優性モデルが危険因子となることが示唆された。

以上、単点 SNP 関連解析から、*hNP* 遺伝子の SNP4、SNP7、SNP23 の各マイナーアレルが躁うつ病患者で有意に多く出現していることが明らかとなり、マイナーアレルを 1 個でも有することが、躁うつ病罹患率を上げる危険因子となる可能性があることが明らかとなった。一方、*hNP* 遺伝子多型と統合失調症および単極性うつ病との関連性は見出せなかった。

2. 連鎖不平衡解析

国際 HapMap 計画により公開されている International HapMap Project ホームページ (http://www.hapmap.org/cgi-perl/gbrowse/hapmap20_B35/) から、日本人 45 名の出現頻度の高い *hNP* 遺伝子上の SNPs 情報を抽出し、そのデータから Haploview プログラムを用いて連鎖不平衡係数値 (D' 値、 r^2 値) を算出した (図 6-a)。さらにそれら連鎖不平衡強度を視覚化した連鎖不平衡ブロックを作製した (図 6-b)。その結果、図 6-a、b に示すとおり、両端に存在する SNP1 と SNP25 の間において、 D' 値および r^2 値が高いことから、*hNP* 遺伝子上にある SNPs が互いに強い連鎖不平衡の関係にあることが明らかとなった。

以上、連鎖不平衡解析により、*hNP* 遺伝子が 1 つの連鎖不平衡ブロックに存在することがわかった。このことより、各 SNP のアレルの組み合わせであるハプロタイプによる関連解析を行うことことで、疾患の原因となるハプロタイプアレル、もしくはそのハプロタイプ上に存在する疾患原因遺伝子座位の同定を、より正確なアプローチにて効率よく行うことができると考えられた。

3. ハプロタイプ解析

疾患との関連性が、遺伝子上の単点 SNP では検出されないが、複数の SNP の組み合わせであるハプロタイプにおいては関連性が見出せる場合がある。これは、複数の SNPs を含む領域の中に真の原因となる変異が含まれている可能性を反映しており、連鎖不平衡を利用すれば、タイピングをしていない SNP についても原因遺伝子変異としてアプローチできる可能性がある (対象と方法 2-6 ハプロタイプ解析 S4 参照)。そこで本研究では、2SNPs および 3SNPs の組み合わせハプロタイプにおいて、各疾患-健常対照群間の比較関連解析を行った。各ハプロタイプ頻度の算出は EM アルゴリズムを用い、COCAPHSE プログラム ver.2.403 にて行った。

表 4-a に示すとおり、統合失調症-健常対照群間では、3 座位ハプロタイプの SNP6T-SNP7A-SNP23A において Individual p -value ; $p=0.08$ となる有意な傾向が見られた。しかし他のいかなる組み合わせハプロタイプにおいては、Individual p -value および Global p -value (ハプロタイプブロック全体における p -value) について有意な差は

得られなかった。単極性うつ病-健常対照群間では、2 座位ハプロタイプの SNP3A-SNP4G でのみ、Individual p -value における有意な差が見られた ($p=0.04$)。その他、3 座位ハプロタイプの SNP3A-SNP4G-SNP6T において Individual $p=0.07$ の傾向が見られた。しかし、Global p -value においては、いずれも有意差が消失した (表 4-b)。単点 SNP 解析において有意な結果が得られた躁うつ病-健常対照群間においては、2SNPs および 3SNPs のいずれのハプロタイプにおいても Individual p -value が $p < 0.05$ となり、患者群に有意に多く見られるハプロタイプが存在していた。特に、SNP7 と SNP23 の 2 座位ハプロタイプで強い有意差が見出された (表 4-c ; SNP3A-SNP4C: $p=0.028$ 、 SNP4C-SNP6A: $p=0.03$ 、 SNP6A-SNP7G: $p=0.028$ 、 SNP7G-SNP23G: $p=0.0068$)。ハプロタイプブロック全体における Global p -value に関しては、2 座位の SNP7-SNP23 のハプロタイプブロックにおいて有意な差がみられた ($p=0.014$)。さらに、単点 SNP での関連解析で有意な関連性を示した SNP4、SNP7、SNP23 の 3 座位ハプロタイプにおいて、同様の解析を行った。その結果、3 座位それぞれのマイナーアレルからなるハプロタイプ : SNP4C-SNP7G-SNP23G が患者群において有意に多く出現することが明らかとなった ($p=0.01$)。

以上、ハプロタイプ解析から、統合失調症および単極性うつ病と *hNP* 遺伝子上にある SNPs のハプロタイプとの間に関連はないことが明らかとなった。一方、躁うつ病に関しては、単点 SNP だけでなく、ハプロタイプにおいても患者群において有意に多く出現しているハプロタイプが存在することが明らかとなり、*hNP* 遺伝子と躁うつ病との関連を支持する結果となった。

転写調節領域にある SNPs の機能解析

躁うつ病との関連が明らかとなった SNP4、7、23 は、それぞれ 5' 上流、イントロン 3、3' 下流に存在する。このことから、これらの SNPs が *hNP* 遺伝子の発現量を調節している可能性が考えられる。そこで、5' 上流に存在し、発現量を調節している可能性が一番高い SNP4 に注目した。さらに、SNP4 より 5' 上流にある SNP1 と SNP2 は、SNPs 検索の結果より SNP4 と完全連鎖していることから、同じく躁うつ病と関連している可能性が考えられる。そこで、SNP1 から SNP4 まで含む 5' 上流領域において、対立遺伝子間で転写活性に差があるか否かをルシフェラーゼアッセイ法により検証した。

予備実験として、上流にある各 SNP (SNP1、SNP2、SNP3、SNP4) が転写活性に及ぼす影響と *hNP* 遺伝子の転写調節領域を精査するため、メジャーアレルで統一させた長さの異なる *hNP* 遺伝子上流フラグメントをもつコンストラクトを 5 種類作製し、ラット初代培養神経細胞 (大脳皮質) に導入後、ルシフェラーゼアッセイ法により転写活性を測定した (図 7)。作製した 5 種類のフラグメント、pGL3-964 : (SNP1、2、3、4 を含む 964bp)、pGL3-600 : (SNP2、3、4 を含む 600bp)、pGL3-369 : (SNP3、4 を含

む 369bp)、pGL3-277 : (SNP4 を含む 277bp)、pGL3-128 (SNP を含まない 128bp) を図 7 に示している。用いたラット初代培養神経細胞は、神経特異的な MAP2 およびグリア細胞特異的な GFAP 抗体を用いた免疫化学的染色法により、その約 8 割が神経細胞であることを確かめた (図 8)。遺伝子の導入効率は、GFP プラスミドを導入させることにより確認したところ、約 40 %であった。この培養系を用いて各コンストラクトを導入した結果、5 種類全てにおいて転写活性が確認されたが、各コンストラクト間で転写活性に顕著な差はなかった (図 7)。このように、含まれる SNPs の数によって転写活性に差が見られなかったことから、SNP1 から SNP4 までを含む最長 pGL3-964 フラグメントにおいて、対立遺伝子間における転写活性の比較解析を行った。

SNP1、SNP2、SNP4 をメジャーアレルで統一した pGL3-964 フラグメント、マイナーアレルで統一した pGL3-964 フラグメント、それぞれを含むコンストラクトをラット初代培養神経細胞 (大脳皮質) に導入し、ルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、SNP1、SNP2、SNP4 の対立遺伝子間において転写活性に有意な差は見られなかった (図 9)。NP はマウス海馬に多く発現していることから (Chen et al., 1995)、ラット海馬由来の初代培養神経細胞において同様の実験を行ったところ、マイナーアレル群での若干の発現上昇が観察されたが有意な差には至らなかった (図 10)。ラット NP 遺伝子上流ゲノムと hNP 遺伝子上流ゲノムの相同性は 52%であり、違いが大きい。そこで、種特異的な影響を考慮するため、ヒト神経芽腫であるヒト Neuroblastoma 培養細胞 (IMR-32) を用いて同様の解析を行ったところ、図 11 に示すように、ポジティブコントロールにおける転写活性は確認できたが、目的フラグメント導入群では転写活性がかなり低い結果となった。

以上、ルシフェラーゼアッセイの結果から、躁うつ病との関連が見られた 5' 上流 SNPs の対立遺伝子間において転写活性に差はないことが明らかとなった。このことから、これら 5' 上流 SNPs が、hNP 遺伝子の発現量を調節する原因 SNPs ではなく、他の原因多型と連鎖しているマーカー SNPs であることが示唆された。

第 1 章 1-2 :

認知機能に与える**Human neuropsin**遺伝子多型の影響

目的

統合失調症をはじめとする精神疾患患者において、記憶・学習能力、および知能指数 IQ (intelligence quotient) の低下が観察されている。さらに近年、認知機能の障害の程度こそが、社会的機能や予後に強く関係することから、機能性精神疾患の中核症状を認知機能障害と考える傾向がある。一方、ヒトと、チンパンジー、ゴリラ、オラウータンなどの類人猿における *hNP* 遺伝子発現の比較解析研究から、*hNP* 遺伝子の splicing variant である Type2 がヒト特異的に発現していることが明らかとなっている。このことから、Type2 をもつ *hNP* 遺伝子が、進化の過程で認知機能といった高度な脳機能獲得に重要な遺伝子である可能性が示唆されている。

本研究第 1 章：1-1 により、*hNP* 遺伝子多型と躁うつ病との関連が明らかとなり、躁うつ病発症に *hNP* 遺伝子が関与する可能性が示唆された。統合失調症と *hNP* 遺伝子多型との関連は示されなかったものの、ヒトの高度な脳機能であり、精神疾患のエンドフェノタイプとして注目されている認知機能（記憶・知能）への *hNP* 遺伝子の影響を検証することは、機能性精神疾患との関連をより具体化させ、認知機能の分子生物学的基盤の解明、さらには精神疾患の新規治療ターゲットの発見につながる可能性がある。このことから、本研究第 1 章：1-2 では、*hNP* 遺伝子多型がヒトの認知機能に及ぼす影響を明らかにすることを目的とし、認知機能測定検査である WMS-R および WAIS-R テストを用いた解析を行った。

対象と方法

1. 対象 (Subjects)

対象は、国立精神・神経センター疾病研究第三部において、既に収集されていた健常者 166 人であり、そのうち男性が 53 人、女性が 113 人、全体の平均年齢は 37.6 ± 12.4 であった。全ての対象者は、過去に精神科受診歴がなく、精神疾患と心身症等の類似疾患の既往および家族歴がないことが確認し、精神科医師による Mini-International Neuropsychiatric Interview (M.I.N.I.) を受けている。また、精神科医師または臨床心理士等から研究目的や参加する研究内容について口頭および書面での説明を受けており、自発的意志のもと研究への参加を表明され、書面で同意が得られている。

尚、本研究は、国立精神・神経センターにおける倫理委員会の審査および承認のもと行った。検体は、いずれも匿名化されており、実験をする上で試料提供者の個人情報

報に触れることはなかった。

2. 神経心理学的検査 (Neuropsychological test)

精神疾患のエンドフェノタイプ (中間表現型) として、実行機能の低下、陳述記憶・ワーキングメモリの障害、注意の配分の障害などが考えられている (Cannon et al., 2000; Conklin et al., 2000; Glahn et al., 2004; Glahn et al., 2003; Sitskoorn et al., 2004)。患者および健常者において、それら認知機能を評価するテスト Wisconsin Card Sorting Test (WCST)、Wechsler Memory Scale, revised version (WMS-R) および Wechsler Adult Intelligence Scale, revised (WAIS-R) を用いた神経心理学的研究が進められている。

本研究では、*hNP* 遺伝子と認知機能 (記憶・知能) との関連性を検証するため、医師または臨床心理士のもと WMS-R、WAIS-R テストにより評価された健常者 166 人のスコアを用いた。

WMS-R; Wechsler Memory Scale, revised (ウエクスラー記憶検査法) (Sugishita, 2001; Wechsler, 1987) とは、青年および成人の記憶の主な側面を評価するための検査で、一対一で検査を行う。

記憶の主な側面には、短期記憶と長期記憶、言語性記憶と非言語性記憶、視覚性記憶、即時記憶と遅延記憶などが含まれる。

WAIS-R; Wechsler Adult Intelligence Scale, revised (ウエクスラー成人知能検査法) (Shinagawa et al., 1990; Wechsler, 1981) とは、成人用の個別知能検査であり、年齢群における標準的な活動水準を基準として言語性 IQ (Intelligence quotient)、動作性 IQ、全検査 IQ を算出する。

全検査 IQ (Full IQ: FIQ) は、被検者の全体的知的水準を示す指標である。

言語性 IQ (Verbal IQ: VIQ) は、被検者の言語性知能の水準を示す指標である。

動作性 IQ (Performance IQ: PIQ) は、被検者の動作性知能の水準を示す指標である。

3. SNP genotyping

解析に用いた SNPs は、躁うつ病との関連が明らかとなった 3 個の SNPs : SNP4、SNP7、SNP23 である。各 SNP の genotyping は、前述第 1 章 2-3 と同様の方法により行った。

4. アポリポ蛋白 E (ApoE) 遺伝子型の決定

アポリポ蛋白 E (*ApoE*) 遺伝子には、アミノ酸置換を伴う 2 つの SNPs の組み合わせ

せにより、3つのアイソフォーム ApoE2、ApoE3、ApoE4 が存在する。
各アイソフォームを形成する対立遺伝子型を $\epsilon 2$ 、 $\epsilon 3$ 、 $\epsilon 4$ と呼ぶ。

2つの SNPs ;

SNP	rs429358	rs7412
塩基 (major / minor)	T / C	C / T
アミノ酸 (major / minor)	Cys / Arg	Arg / Cys

3つの ApoE アイソフォームを形成する対立遺伝子の組み合わせ ;

対立遺伝子 (isoform)	rs429358	rs7412
$\epsilon 2$ (ApoE2)	T (Cys)	T (Cys)
$\epsilon 3$ (ApoE3)	T (Cys)	C (Arg)
$\epsilon 4$ (ApoE4)	C (Arg)	C (Arg)

ApoE 遺伝子型 ;

	rs429358- rs7412	rs429358- rs7412
$\epsilon 2 \epsilon 2$	T (Cys)- T (Cys)	T (Cys)- T (Cys)
$\epsilon 2 \epsilon 3$	T (Cys)- T (Cys)	T (Cys)- C (Arg)
$\epsilon 2 \epsilon 4$	T (Cys)- T (Cys)	C (Arg)- C (Arg)
$\epsilon 3 \epsilon 3$	T (Cys)- C (Arg)	T (Cys)- C (Arg)
$\epsilon 3 \epsilon 4$	T (Cys)- C (Arg)	C (Arg)- C (Arg)
$\epsilon 4 \epsilon 4$	C (Arg)- C (Arg)	C (Arg)- C (Arg)

2つの SNPs : rs429358- rs7412 の対立遺伝子の組み合わせの中に、C (Arg)- T (Cys) は存在しない。従って、2つの SNPs をそれぞれヘテロ型で持っている人 (T/C-C/T) を、 $\epsilon 2 \epsilon 4$ の遺伝子型であると決定できる。

このようなメカニズムで、2つの SNPs の TaqMan probe を用いた genotyping により、ApoE 遺伝子型を決定することができる。

各 SNP に用いた probe および PCR 反応液、PCR 反応条件は以下の通りである。

SNP (rs429358) :

各 probe および primer は、Koch W et al., 2002(Koch et al., 2002)を参考に、Applied Biosystem (ABI) 社に作製依頼した。

Primer (F) : 5'-GGGCACGGCTGTCCAA-3'

Primer (R) : 5'-ACCTCGCCGCGGTACTG-3'

probe1 5'-VIC-CGGCCGCGCACGTCCT-3'

probe2 5'-FAM-CGGCCGCGCACGTCCTCC-3'

PCR 反応液組成 :

TaqMan Universal PCR Mastermix (Applied Biosystem)		2.5 μ l
Probe assay mix (10 μ M)	(最終 0.1 μ M) 各	0.05 μ l
Primer (36 μ M)	(最終 0.45 μ M) 各	0.0625 μ l
DW		2.275 μ l
<hr/>		
Total		5 μ l

PCR 反応条件 :

<hr/>	
95°C, 10 分	
<hr/>	
95°C, 15 秒	
<hr/>	
60°C, 1 分	50 cycles
<hr/>	
4°C, ∞	

SNP (rs7412) :

ABI 社既製の TaqMan-Probe を用いた。

Probe の配列 ;

CCGCGATGCCGATGACCTGCAGAAAG[C/T]GCCTGGCAGTGTACCAGGCCGGGGC

PCR 反応液組成および PCR 反応条件は、前述の第 1 章 2-3 *SNP genotyping* の通りである。

どちらの SNPs も、ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System and SDS Enterprise Database にて解析を行い、遺伝子型を決定した。

5. 統計解析

認知機能（記憶・知能）検査結果の各種スコアと、*hNP* 遺伝子型との関連解析は、性別、年齢および教育年数で統制した共分散分析法にて行った。各種スコアを従属変数とし、固定因子として性別および遺伝子型を投入、共変量として年齢と教育年数を投入し解析を行った。固定因子である遺伝子型と共変量との交互作用の検証の後、検定を行い、有意水準にて判定を行った。統計値の算出には SPSS software 11.0J (SPSS Japan Inc.)を用いた。有意水準は、 $p < 0.1$ で有意の示唆、 $p < 0.05$ で有意と判定した。

結果

認知機能測定検査である WMS-R および WAIS-R テストによって評価された健常者 166 人の記憶力スコアおよび IQ スコアを、各 SNP の遺伝子型において比較解析を行った。解析には躁うつ病との関連が明らかとなった SNP4、7、23 を用いた。それぞれの遺伝子型においてマイナーアレルを一つ以上持つ群 (Minor allele-carrier; ヘテロ型とマイナーアレル ホモ型の人) とメジャーアレルのみを持つ群 (Major allele-homo) の 2 群間で有意な差があるか否かを性別、年齢、教育年数を統制した共分散分析により検証した。なお、マイナーアレルのみを持つ群 (Minor allele-homo) の人数は、SNP4 では 10 人、SNP7 では 14 人、SNP23 では 8 人と少なかったため、Major allele-carrier 群と Minor allele-homo 群との解析は行わなかった。

健常者 166 人中、ジェノタイピングに成功し、解析に用いた健常者人数は、SNP4 では 149 人、SNP7 と SNP23 に関しては 163 人であった。SNP7 と SNP23 について解析を行った健常者 163 人の記憶力テスト、知能テストの各スコアの平均値 (標準偏差値) は、言語性記憶 110.9 (13.7)、視覚性記憶 109.9 (9.0)、一般的記憶 112.2 (12.1)、注意・集中力 103.9 (13.5)、遅延再生 112.1 (12.0)、全 IQ109.3 (11.6)、言語性 IQ107.3 (12.9)、動作性 IQ110.3 (11.7) であった。SNP4 について解析を行った健常者 149 人の記憶力テスト、知能テストの各スコアの平均値 (標準偏差値) は、言語性記憶 110.7 (13.7)、視覚性記憶 110.03 (9.0)、一般的記憶 112.0 (12.2)、注意・集中力 103.3 (13.4)、遅延再生 112.0 (11.9)、全 IQ108.6 (11.4)、言語性 IQ106.6 (12.9)、動作性 IQ109.8 (11.5) であった。

各 SNP の Minor allele-carrier 群 と Major allele-homo 群の 2 群間比較解析を行った結果、SNP4 および SNP23 では、注意・集中力、全 IQ、言語性 IQ において、SNP7 については全 IQ および言語性 IQ において有意な差を認め、いずれも Minor allele-carrier 群のスコアが有意に低いことがわかった (注意・集中力; SNP4 $p=0.012$ 、SNP23 $p=0.016$ 、全 IQ; SNP4 $p=0.017$ 、SNP7 $p=0.037$ 、SNP23 $p=0.018$ 、言語性 IQ; SNP4 $p<0.001$ 、SNP7 $p=0.004$ 、SNP23 $p<0.001$) (図 12)。

興味深いことに、アルツハイマー病の発症危険因子の一つであるアポリポ蛋白 E (*ApoE*) 遺伝子と *hNP* 遺伝子が、ゲノム上において非常に近距離に存在していることがわかっており、その差は約 6Mbp である (*hNP* 遺伝子: 19q13.3-q13.4、*ApoE* 遺伝子: 19q13.2)。ApoE にはアミノ酸置換を伴う 2 つの SNPs の組み合わせにより、3 つのアイソフォーム ApoE2、ApoE3、ApoE4 が存在し、各アイソフォームを形成する対立遺伝子型を $\epsilon 2$ 、 $\epsilon 3$ 、 $\epsilon 4$ と呼ぶ。先行研究により、 $\epsilon 4$ がアルツハイマー病の危険因子であると考えられており、実際にアルツハイマー病発症率が、 $\epsilon 4$ を持つ人では持たない人に比べて 4 倍高いことが報告されている (Saunders et al., 1993; Strittmatter et al., 1993a; Strittmatter et al., 1993b)。アルツハイマー病は、異常なタンパク構造物が脳内に蓄積して神経変性を伴う痴呆症であり、進行性の記憶力の低下などの認知機能

障害が主徴である。そこで、*hNP* 遺伝子多型と認知機能との関連が *ApoE* 遺伝子の影響ではないことを証明するため、解析を行った対象者の *ApoE* 遺伝子型の決定を行い、発症危険因子 $\epsilon 4$ を持たず、 $\epsilon 3$ をホモで持つ遺伝子型 ($\epsilon 3 \epsilon 3$) の人のみを選択し、再び *hNP* 遺伝子多型と記憶力スコアおよび IQ スコアとの関連解析を行った。解析に用いた $\epsilon 3 \epsilon 3$ 遺伝子型健常者人数は、SNP4 では 116 人、SNP7 と SNP23 に関してはそれぞれ 126 人である。解析の結果、SNP4、SNP23 については先述と同じ項目である注意・集中力、全 IQ および言語性 IQ において有意な差がみられ、いずれも Minor allele-carrier 群では Major allele-homo 群に比べて各スコアが有意に低かった（注意・集中力；SNP4 $p=0.036$ 、SNP23 $p=0.012$ 、全 IQ；SNP4 $p=0.034$ 、SNP23 $p=0.016$ 、言語性 IQ；SNP4 $p=0.001$ 、SNP23 $p=0.001$)。SNP7 については、言語性 IQ においてのみ、Minor allele-carrier 群における有意な低下が確認され ($p=0.007$)、注意・集中力および全 IQ に関してはそれぞれ $p=0.095$ 、 $p=0.051$ となり、有意な傾向にとどまった (図 13)。

以上、*hNP* 遺伝子多型と認知機能との関連を検証した結果、注意・集中力、全 IQ および言語性 IQ といった認知機能に *hNP* 遺伝子が関わっている可能性が示唆された。そして、得られた有意な関連は、近傍の *ApoE* 遺伝子の発症危険因子の影響を受けていないことが明らかとなった。

考察

本研究により、*hNP* 遺伝子多型が躁うつ病、注意・集中力、言語性 IQ に関連することが明らかとなり、*hNP* 遺伝子そのものが、躁うつ病発症脆弱性に影響を及ぼす遺伝子の一つであること、さらには注意・集中力、言語性 IQ などの認知機能に重要な遺伝子である可能性が示唆された。

hNP と同じセリンプロテアーゼに、neurotrypsin (PRSS12) や tissue plasminogen activator (tPA) などがある。neurotrypsin は、胎児および成人脳において皮質や海馬に存在し、シナプス結合部位の前シナプス終末に発現していることがこれまでに確認されている。2002年に、この neurotrypsin の4塩基の欠失多型が精神遅滞(mental retardation: MR)の原因遺伝子であることが、罹患同胞対解析により明らかとなった(Molinari et al., 2002)。tPA は、不活性型 plasminogen を活性型 plasmin に変換させる機能を持つ。成人脳において、tPA は大脳辺縁系や視床、小脳皮質や新皮質などのニューロンでの発現が確認されている(Teesalu et al., 2004)。tPA はシナプス可塑性に重要であると考えられており(Qian et al., 1993)、tPA は LTP の後期相に関与していることが明らかとなった(Frey et al., 1996; Huang et al., 1996; Komai et al., 2000)。別の tPA の機能のとして、躁うつ病の発症脆弱性や病態に関連すると考えられている BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) を、proBDNF (前駆体) から matureBDNF へ切断、活性化させることが報告されている(Pang et al., 2004)。tPA とほぼ共発現しているニューロセルピン (tPA のインヒビター) が、家族性痴呆症の原因遺伝子であるという報告もあった(Davis et al., 1999)。このように、セリンプロテアーゼの精神疾患への関与が注目されている中、今回 *hNP* 遺伝子と躁うつ病との関連性が示唆されたことは、セリンプロテアーゼと精神疾患の発症・病態との関連を支持するものとなった。

hNP 遺伝子は1998年、Yoshida らによってクローニングされ(Yoshida et al., 1998)、19番染色体(19q13.3-13.4)に存在することが明らかとなっている(Gan et al., 2000; Harvey et al., 2000)。ヒト19番染色体は、ヒト染色体の中で最も遺伝子密度が高く、DNA 反復配列が多いことから、生物学的な進化の面からも非常に重要と考えられる(Grimwood et al., 2004)。特に *hNP* 遺伝子が位置する19q13領域は、アルツハイマー病、筋緊張性ジストロフィー、パーキンソン病などの神経変性疾患に関係するといわれており、ゲノムワイドな連鎖解析研究で19番染色体が統合失調症、躁うつ病と関連しているという報告もある(Badenhop et al., 2002; Macgregor et al., 2004)。興味深いことに、*hNP* 遺伝子の splicing variants の1つである Type2 が、ヒト特異的に中枢神経系で発現していることが知られており、これは高次脳機能の進化に *hNP* 遺伝子が重要であることを示唆している(Li et al., 2004)。既に本研究室において、マウスを用いた電気生理学的な実験および行動実験により、NP が記憶・学習機能、さらには不安などといった情動にも関与していることが報告されている(Horii et al., 2008; Komai et al., 2000; Tamura et al., 2006)。すなわち、この *hNP* におけるなんらかの異常が、認知機能の低

下や中枢神経系に異常が見られる統合失調症や躁うつ病などの精神疾患の発症に関与している可能性が考えられる。そこで私は、SNPs をマーカーとした患者-健常対照群間比較関連解析を行うことにより、*hNP* 遺伝子と精神疾患および精神疾患の中間表現型と考えられている認知機能（記憶・知能）との関連性を検証することにした。さらに、関連が明らかとなった SNP については、原因 SNP であるか機能解析により確認した。

SNPs検索として、24 人の統合失調症患者のゲノムDNAを用いて、*hNP*遺伝子のSNPsスクリーニングを行ったところ、28 個のSNPsを同定した。そのうち9 個は、National Center for Biotechnology Information (NCBI)から公開されているdbSNPデータベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) に未記載のSNPsであったことから、本研究においてダイレクトシーケンスすることにより、日本人が所有する新規SNPsを同定することができた。このことは、SNP解析のツールとして、最も情報量が多いことから世界中で利用されているdbSNPデータベースに登録されているSNP以外にも、まだ多くのSNPもしくは日本人特有のSNPが存在することを示している。

SNP22 は唯一 exon 内に存在する cSNP であり、対立遺伝子によってバリンからイソロイシンへとアミノ酸置換を伴うことから、*hNP* の機能的変化をもたらす原因 SNP として期待された。しかし、追加検索および RFLP 解析の結果、SNP22 が 178 人中 1 名にのみ存在する多型であることがわかった。遺伝学的には、一般人口中で 1%以上の割合で存在している遺伝子多型を SNP と規定することになっている。そのため、SNP22 は、今回偶然発見された新規突然変異と考えられ、本研究では頻度が少なく検定できないことから除外することにした。しかし、稀な変異が疾患の原因となる可能性は十分に考えられ、最新の研究では、個人の全ゲノムシーケンスが短期間で行えるという技術の進歩も伴い、疾患の原因遺伝子変異となるレアバリエーションの検出もトレンドとなってきている。(Cheng and Chen, 2007; Meyer et al., 2005; Moser et al., 2008)。SNP22 をヘテロ型で保有していた唯一の統合失調症患者の症状について調べてみたところ、非常に興味深いことに、統合失調症の症状は重度であった。SNP22 が存在する exon6 には、*hNP* のプロテアーゼドメインであるセリン残基が存在する。従って、SNP22 の変異がプロテアーゼ機能に影響を及ぼす可能性も考えられる。今後、この SNP22 を持つ家系を用いた連鎖解析および SNP22 の機能解析を行うことは、統合失調症発症メカニズムの解明につながる可能性があり、病態解明の有効なアプローチになると考える。

今回関連解析に用いた SNP3、4、6、7、23 のうち、SNP3 に関してのみ、単極性うつ病患者群における遺伝子多型の頻度分布がハーディ・ワインベルグ平衡から逸脱していた。これは、単極性うつ病患者に有意にホモ遺伝子型個体が多かったことに起因していた。このことから、単極性うつ病の病因に SNP3 が影響している可能性が考えられたが、後の患者-健常対照群間関連解析においては、健常対照群との間に遺伝子型頻度、対立遺伝子型頻度ともに統計的に有意差が見られなかったため、疾患に影響するものではないと判断した。

関連解析の結果、躁うつ病患者群と健常者群との間において、SNP4、SNP7、SNP23（5'上流、イントロン 3、3'下流に局在）の対立遺伝子頻度に有意な差を同定し、各マイナーアレルが患者群で有意に多く存在することが明らかとなった。このことから、各マイナーアレルが危険因子である可能性が考えられた。他に考えられる注意すべき点として、解析に用いた健常者の多くは東京在住者であったが、躁うつ病患者群の半数以上が滋賀県在住者であった。このため、日本人集団は、遺伝医学的解析においては均質であり関連解析において問題はないという考えが主流ではあるものの、サンプリングの階層化の問題が考えられた。しかし、東京在住の健常者と滋賀で協力していただいた健常者間で、SNP23のマイナーアレル頻度に差はなかったため（滋賀： $p=0.233$ 、東京： $p=0.232$ ）、今回得られた対立遺伝子頻度の差は、地理的隔離による影響を受けておらず、階層化の問題がないと判断した。続いて、SNP 4、SNP7、SNP23 それぞれについて、マイナーアレルを持つことがどの程度躁うつ病発症率を高めるか調べてみたところ、約 1.3 倍から 1.5 倍の危険率の上昇であった。複数の寄与率の低い原因因子が関与していると考えられている多因子疾患では、このような、弱くはあるが、影響力のある遺伝子を多数同定していくことが、精神疾患の病態全貌解明につながることを考えられている。さらに本研究では、それぞれの SNP のアレル伝達と表現型のモデルを適応し、1 つでもマイナーアレルを持つことが躁うつ病への危険要因となっていることを明らかにし、このことから、有意であったマイナーアレルが、優性モデル（carrier）の遺伝形式として影響を与えていることが考えられた。

連鎖不平衡解析により、*hNP* 遺伝子上のほとんどの SNPs はお互い強い連鎖不平衡状態にあり、一つの連鎖不平衡ブロックに存在することを示した。そこで、関連解析で用いた 5 つの SNPs を代表 tag-SNPs とし、ハプロタイプ解析を行ったところ、統合失調症および単極性うつ病と *hNP* 遺伝子上にある SNPs のハプロタイプとの関連は見られず、躁うつ病とのみ関連が見られた。このことは単点 SNPs 解析の結果を支持し、これら SNPs が疾患感受性原因因子そのものであるか、ハプロタイプ領域内に存在する他の SNP が躁うつ病の原因 SNP であることを示唆している。また、単点において躁うつ病との関連が明らかとなった 3 つの SNPs（SNP4、SNP7、SNP23）からなるハプロタイプでは、躁うつ病の発症危険率が増すかどうか確かめたところ、躁うつ病患者に有意に多く出現しているハプロタイプ（各 SNP の疾患感受性アレルであるマイナーアレルの組み合わせであった）の存在は確認できたが、単点 SNP 解析で得られた p -value 値と大差なく、危険率を高めるとは断言できなかった。このことは、それぞれが原因 SNP である場合、影響力は弱く、3 つが相乗して発症に関与しているものではないことが考えられる。一方で、真の原因 SNPs と連鎖しているマーカーである可能性も強い。

遺伝統計学的に躁うつ病との関連が明らかとなった SNP4、SNP7、SNP23 が、疾患発症・病態の原因多型そのものである可能性を検討するため、SNPs 機能解析を行った。本研究では 5'上流に存在し、転写活性に影響を与えている可能性が考えられる SNP4（SNP 4 と完全連鎖している SNP1、SNP2 も含む）に注目し、対立遺伝子によ

って転写活性に差があるか否かを、ラット初代培養神経細胞（大脳皮質、海馬）およびヒト Neuroblastoma 培養細胞を用いたルシフェラーゼアッセイ法により検証した。しかし、いずれにおいても顕著な差は得られなかった。ヒト Neuroblastoma 培養細胞での hNP の転写活性は低レベルであったが、ヒト中枢神経系での hNP の発現は確認されていることから(Li et al., 2004; Lu et al., 2007; Mitsui et al., 1999; Shimizu-Okabe C, 2001)、今回用いた培養細胞系の特異性の影響も考えられる。以上の結果から、SNP4 が転写活性に直接影響を及ぼす原因 SNP ではなく、他の原因 SNP と連鎖しているマーカー SNP である可能性が考えられた。実際、上流領域の転写因子結合候補領域を TFSEARCH database (<http://mbs.cbrc.jp/research/db/TFSEARCHJ.html>) にて検索したところ、現時点ではこれら上流 SNPs を含む領域に結合する主要な転写調節因子は示されなかった。このことは、ルシフェラーゼアッセイの結果を支持するものではあるが、転写調節因子の種類が多いため、結合する転写調節因子の存在を完全に否定するものではない。また、生体内において、強い刺激により神経活動が過活動になった場合、多くの遺伝子の発現が調節されることは良く知られている。よって、今回用いた細胞系において、神経過活動を増強させた状態（例えばシグナル伝達物質であるグルタミン酸などを投入させ神経活動を上げた状態）では、SNP4 の対立遺伝子間において転写活性に差が見られる可能性があり、今後検討することは意義のあることと考える。

続いて、SNP7、SNP23 が原因 SNP であることが考えられる。SNP7 は exon 4 上流 10bp に位置することから、intron3 のスプライシング機構に関与し、intron3 が正常にスプライシングされなかった場合、exon4 下流に存在するプロテアーゼドメインが正常に機能しない可能性が考えられる。SNP23 は関連のある SNPs の中でも、一番強い関連性を示した ($p=0.0015$)。また、ハプロタイプ解析でも、SNP23 を含むハプロタイプにおいて Individual- p 、Global- p とともに躁うつ病-健常対照群間で有意な差が得られた。この SNP23 が原因 SNP である場合、3'下流 69bp に位置しているため、mRNA の安定性、細胞内局在などに影響を及ぼす可能性がある。これまでに、他の疾患と関連が見られた 3'領域の多型がいくつか報告されており、microRNA 結合サイトに存在している多型もある。実際、強迫性障害患者やトゥレット症候群患者の中に、3'UTR にある microRNA 結合サイト内に変異多型：マイナーアレルが存在する人がおり、そのマイナーアレルが存在すると、microRNA との結合効率が上がり、分解が促進されるという報告がある(Abelson et al., 2005; Chen et al., 2006; Chuzhanova et al., 2007)。これらの研究結果から、SNP23 が hNP の発現量を調節している可能性は充分考えられる。さらに、SNP23 においては非常に興味深い事実が明らかとなった。他の類人猿（チンパンジー、アカゲザル）において、SNP23 の遺伝子型を UCSC (University of California Santa Cruz) データベース (<http://genome.ucsc.edu/>) で調べたところ、SNP23 のマイナーアレルを、それら類人猿はホモ型で持っていた。このことは、SNP23 のメジャーアレルが、進化の過程で脳の高次機能の発達において、極めて重要な役割を果たした可能性を暗示している。いずれにしても、hNP 遺伝子多型と精神疾患との関連については、国内および民族を超えた集団での追試が待たれるところであり、より多くのデー

タによる解析が必要と考える。

序論でも述べたように、*hNP* 遺伝子が存在する 19 番染色体には、DNA 反復配列が多く存在しており、*hNP* 遺伝子、別名カリクレイン類似 8 (*kallikrein* : *klk* 8) 遺伝子の近傍にも多くのカリクレイン関連遺伝子がタンデムに局在し、クラスター形成していることがわかっている (*klk1-klk15*)。Badenhop らの報告によると、*hNP/klk* 8 が存在する 19q13 領域が躁うつ病と関連している(Badenhop et al., 2002)ことから、今回見出した *hNP* 遺伝子の SNPs が、同じ連鎖不平衡ブロック内にある別のカリクレイン遺伝子上の SNP と連鎖している可能性もある。今後はこのような点を踏まえ、より領域を広げた連鎖不平衡解析ならびに関連解析を行うべきと考える。そして、SNP7 や SNP23 などの関連が見られた SNPs について、原因 SNP であるのか、マーカー SNP であるのか、機能解析にて確かめる必要がある。

精神疾患との関連性を調べる上で、ゲノムレベルだけでなく、精神疾患のエンドフェノタイプとして注目されている認知機能との関連性を検証した。患者群における服薬などの治療の影響を除外するため、今回は健常者の認知機能テストスコアのみを用いた。解析の結果、躁うつ病との関連が見られた SNP 4、SNP7、SNP23 は、注意・集中力および言語性 IQ とも関連していることが明らかとなり、各 SNPs それぞれにおいて、マイナーアレルを一つでも持つことが、注意・集中力および言語性 IQ のスコアを下げる方向に働くことを示した。また、これら有意な関連が、*hNP* 遺伝子の近距離に局在するアルツハイマー病の発症危険因子の一つである *ApoE* 遺伝子によるものではなかったことから、*hNP* 遺伝子多型単独でこれら認知機能に影響を及ぼしていることが明らかとなった。ここで注目すべき点として、関連があった注意・集中力や言語性 IQ を評価するテストの中に、数唱と呼ばれる検査がある。これは検査者が言う数字を、同じ順序もしくは逆の順序で復唱することが被検者に求められ、このことから、この検査は短期記憶を必須とするワーキングメモリ（作業記憶）の尺度と考えられている。マウス NP が短期記憶に関わる分子であることを踏まえて考察すると、*hNP* がワーキングメモリに対して重要な役割を担っている可能性は十分に考えられる。これまでに躁うつ病患者において、これらワーキングメモリを含む認知機能の低下を報告した例があることから(Bruno, 2006; Daban et al., 2006; Schretlen et al., 2007)、*hNP* の異常が躁うつ病患者に見られる認知機能の低下に関与している可能性が考えられる。

認知機能の低下を含め、統合失調症、単極性うつ病、躁うつ病ではいくつかの類似症状がある。これまでの連鎖解析や関連解析においても、複数の疾患にまたがって関連が見出された連鎖部位や遺伝子は多い。例えば染色体 18p11、13q32、22q11-13 領域や *G72/G30* 遺伝子、*AKT1* 遺伝子などが挙げられる(Detera-Wadleigh and McMahon, 2006; Farmer et al., 2007; Thiselton et al., 2008; Toyota et al., 2003; Verma et al., 2005a; Verma et al., 2005b)。死後脳を用いた解析でも、大脳皮質や大脳辺縁系の灰白質体積の減少、ドーパミン受容体の D2 受容体の増加、D1 受容体の減少、内側側頭葉でのグルタミン酸受容体の異常など共通点が多く見つかっている(Beneyto et al., 2007)。このことから、1 遺伝子が複数の精神疾患の発症、病態に関わっている可能性は大きいと

考えられる(Berrettini, 2003; Moskvina et al., 2008)。本研究では、*hNP* 遺伝子多型と躁うつ病とのみ関連が認められたが、他の精神疾患への関与を完全に否定したものではなく、他の研究施設での追試解析が待たれる。また、統合失調や単極性うつ病と共通のエンドフェノタイプである認知機能との関連が見いだされたことから、それらの疾患についても、前疾患状態もしくは診断という点で新たな基準となりうる可能性はある。一方で、躁うつ病特有の *hNP* 遺伝子の機能も非常に興味深い。序論でも述べたように、躁うつ病患者に処方される気分安定薬（リチウム、バルプロ酸、カルバマゼピン）の作用にシナプス可塑性への関与が言われている。元来、抗躁病薬として発見されたリチウムやバルプロ酸の作用機序の一つとして、LTP 誘導に重要である AMPA 受容体のリン酸化を減少させ、細胞膜への AMPA 輸送を減らすという報告がある(Du et al., 2004)。一方で、リチウムやバルプロ酸が LTP を誘導させ、シナプス伝達効率を上げるという報告もある(Rinaldi et al., 2007; Shim et al., 2007)。これは、リチウムやバルプロ酸が、躁病相だけでなく、うつ病相にも効果が見られるという裏付けになると考えられる。このような2つの病相からなり、シナプス可塑性の異常が考えられている躁うつ病に、*hNP* はどのように関与していると考えられるだろうか。これまでの電気生理学的な研究により、NP がシナプス可塑性に関与していることが明らかとなっている(Ishikawa et al., 2008; Komai et al., 2000; Okabe et al., 1996; Tamura et al., 2006)。例えば、NP 欠損マウスでは、LTP の早期過程が阻害されることが知られている。また、マウス海馬において、LTP を誘導する刺激により NP の発現は上昇し、活性化されることが報告されている(Yoshida and Shiosaka, 1999)。そして、活性型 NP が AMPA 受容体のリン酸化を促進させることも明らかとなっている。一方で、高濃度の活性型リコンビナント NP (r-NP) は、シナプス伝達効率が抑制 (LTD) される際に起こる AMPA 受容体の脱リン酸化を誘導するという報告もある(Tamura et al., 2006)。これらのことから、*hNP* 遺伝子の異常により、過剰な *hNP* 遺伝子の発現および活性化が起こると、AMPA 受容体のリン酸化が増強され、過度なシナプス伝達による躁病相が見られる可能性、一方で *hNP* 濃度がある閾値を越えた高濃度に達すると、AMPA 受容体の脱リン酸化が誘導され始め、逆の現象であるうつ病相が現われる可能性が考えられる。つまり、*hNP* の発現量の異常がシナプス伝達効率に影響を及ぼし、躁うつ病の発症・病態に関係していることが考えられる。

本研究は、複雑疾患である躁うつ病の原因遺伝子解明において、*hNP* 遺伝子という新たな疾患感受性候補遺伝子を提示し、さらにその遺伝子が、ワーキングメモリを必要とする注意・集中力および言語性 IQ といった認知機能に関与する可能性を明らかにしたことは、躁うつ病の発症・病態を解明する上で大変意義深い。世界的にみると *hNP* についての機能解析はこれまでほとんど行われておらず、*splicing valiant* である Type 1 と Type2 の機能の違いも明らかではない。今後、異なる母集団を用いた関連解析による追試試験や原因 SNPs を特定することと並行して、*hNP* (Type 1、Type2) そのものの機能解析や関連性が得られた認知機能に関わる脳領域と *hNP* 遺伝子との関係を明らかにすることは、認知機能の分子生物学的な基盤解明につながり、躁うつ病

だけでなく、その他の機能性精神疾患の新たな発症メカニズムの解明につながることで期待される。

多因子疾患である精神疾患の発症においては、多くの要因が仮説として考えられており、遺伝的要因と環境的要因とが複雑に絡んでいると考えられている。脆弱性遺伝子に関しても（今回の研究も含めて）膨大な報告が存在するが、どこまで真の病態を規定するものなのか詳細がはっきりしないことが多い。これは、疾患における遺伝的要因の寄与において、個人レベルでさえ感受性が異なることに起因すると考えられる。しかし、本研究で用いた集団遺伝学的な関連解析は、精神疾患のような多因子疾患の遺伝子解析に有効な研究方法であり、寄与が小さい原因遺伝子の特定が可能な方法である。さらに、統一性の高いエンドフェノタイプとの解析を行うことで、原因遺伝子の特定はかなり実現可能となってきた。今後の医療では、個々人の病態に十分に対応した、キメの細かい医療（オーダーメイド医療）が必要になると思われる。そのオーダーメイド医療実現を確実なものとするためにも、本研究のような、脆弱性遺伝子の地道な発見と、遺伝子変異を原因とする生物学的なエンドフェノタイプの詳細な評価がますます必要となるであろう。このような大規模関連解析と生物学的な機能解析を併せて行うことにより蓄積される信頼性の高い情報は、真の病態解明、新しい抗精神病薬候補の発見、および新規治療法の開発に大きく貢献すると期待できる。

第 2 章

Human neuropsin 遺伝子多型と アルツハイマー病との関連解析

序論

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease: AD) は、進行性の記憶障害、認知機能障害を主徴とする神経疾患である。病理学的所見として、脳の萎縮に加え、老人斑と神経原繊維変化による異常構造物が認められる。老人斑は、アミロイド β 蛋白質 ($A\beta$) が凝集・沈着したものであり、神経原繊維変化は異常にリン酸化されたタウ蛋白質が分解されずに蓄積されることによっておこる。これまでに、*APP* 遺伝子 (*APP*:アミロイド前駆体蛋白遺伝子, Chr:21q21.2-21.3) や *PSEN1* 遺伝子 (*PS1*:presenilin 1, Chr:14q24.3)、*PSEN2* 遺伝子 (*PS2*:presenilin 2, Chr:1q31-q42) が家族性アルツハイマー病 (Familial AD: FAD) の原因遺伝子として (Goate et al., 1991; Levy-Lahad et al., 1995; Rogaev et al., 1995; Sherrington et al., 1995)、また *ApoE* 遺伝子 (Apolipoprotein E, Chr:19q13.2) や *SORL1* 遺伝子 (Sortilin-related receptor 1, Chr:11q23.2-q24.2) が発症リスクをあげる危険因子として同定されている (Rogaeva et al., 2007; Saunders et al., 1993; Strittmatter et al., 1993a; Strittmatter et al., 1993b)。

APP は $A\beta$ の前駆体であり、老人斑の形成を促進する $A\beta$ 42 が、*APP* 遺伝子上の点突然変異によって、増加するという報告がある (Theuns et al., 2006)。*PS1* や *PS1* と高い相同性をもつ *PS2* は、 γ セクレターゼによる *APP* の膜内部分の切断を調節していると考えられており (De Strooper et al., 1998)、*PS* の変異により $A\beta$ 42 の増加が確認されている (Borchelt et al., 1996; Scheuner et al., 1996)。*ApoE* は、血漿中で脂質と結合しており、細胞内コレステロール・ホメオスターシスや神経細胞損傷後の修復における脂質の輸送に重要な分子である。*ApoE* にはアミノ酸置換を伴う 2 つの SNPs の組み合わせにより、3 つのアイソフォーム *ApoE2*、*ApoE3*、*ApoE4* が存在し、各アイソフォームを形成する対立遺伝子型を ϵ 2、 ϵ 3、 ϵ 4 と呼ぶ。これらのうち、 ϵ 4 がアルツハイマー病の危険因子の一つと考えられている。*ApoE4* のアルツハイマー病発症における作用として、アイソフォームの中でもっとも抗酸化作用が弱いことや (Miyata and Smith, 1996)、内因性コレステロール合成が行われなくなった神経細胞を細胞死誘導させること (Michikawa and Yanagisawa, 1998) などが挙げられる。一方、*SORL1* 遺伝子は、*ApoE* 遺伝子以来の有力なアルツハイマー病関連遺伝子として 2007 年に同定され、その作用機序として、*APP* のエンドサイトーシスを解した細胞内取り込み、細胞内輸送に関与している *SORL1* が、変異により発現低下すると、*APP* の $A\beta$ 産生区画への輸送増加が起こり、 $A\beta$ の増加、沈着が起こると考えられている。*APP* 遺伝子や *PSEN1*、*PSEN2* 遺伝子は、FAD 家系による解析から同定された原因遺伝子であるが、*APP* 遺伝子の変異により発症する家系は FAD 全体の 5%未満であり、*PSEN1*、*PSEN2* 変異患者もアルツハイマー病全体からみると極めて少数である。これらのことと、アルツハイマー病の一番の危険要因が高齢であること、また大多数のアルツハイマー病患者が非遺伝性の弧発性アルツハイマー病であることから、アルツハイマー病は環境要因と複数の遺伝子が複雑に関与する多因子疾患であると考えられている。

一方、第1章序論でも述べたように、マウス NP が記憶・学習に重要な分子であること、また、本研究において、*hNP* 遺伝子と認知機能（記憶・知能）との関連が示唆されたこと、さらには、2001年に Shimizu-Okabe らが、アルツハイマー病患者の死後脳において *hNP* mRNA 量が上昇していたことを報告していることから (Shimizu-Okabe C, 2001)、*hNP* 遺伝子がアルツハイマー病発症もしくは病態に関与している可能性は十分に考えられる。

目的

本研究第2章では、アルツハイマー病と *hNP* 遺伝子との関連性を遺伝統計学的に明らかとすることを目的として、第1章と同様の方法である患者-健常対照群間関連解析を行い、さらに、*hNP* 遺伝子近傍に位置するアルツハイマー病の危険因子 *ApoE* 遺伝子の影響を考慮し、*hNP* 遺伝子単独の寄与率を明らかとする。

対象と方法

1. 対象 (Subjects)

対象は、国立精神・神経センターにおいて、既に収集されていたアルツハイマー病患者 752 人（男性 256 人、女性 496 人、全体平均年齢 73.0 ± 8.79 ）と健常対照者 750 人（男性 305 人、女性 445 人、全体平均年齢 73.69 ± 5.85 ）である。患者に対する診断は、国際診断基準である Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder (DSM-IV; American Psychiatric Association 1994) に基づき、少なくとも 2 人以上の精神科医によって行われた。健常対照者は、過去に精神科受診歴がなく、精神疾患と心身症等の類似疾患の既往および家族歴がないことを確認した。患者および健常対照者は、いずれも精神科医師または臨床心理士等から研究目的や参加する研究内容について口頭および書面での説明を受けており、自発的意志のもと研究への参加を表明され、書面で同意が得られている。

尚、本研究は、国立精神・神経センターにおける倫理委員会の審査および承認のもと行った。検体は、いずれも匿名化されており、実験をする上で試料提供者の個人情報に触れることはなかった。

2. SNP genotyping

解析に用いた SNPs は、第 1 章 : 1-1 で用いた 5 つの SNPs と同じ、SNP3、SNP4、SNP6、SNP7、SNP23 である。各 SNP の genotyping は、前述第 1 章 2-3 と同様の方法により行った。

3. アポリポ蛋白E (ApoE) のアイソフォームと遺伝子型

ApoE にはアミノ酸置換を伴う 2 つの SNPs (rs429358, rs7412) の組み合わせにより、3 つのアイソフォーム ApoE2、ApoE3、ApoE4 が存在し、各アイソフォームを形成する対立遺伝子型を $\epsilon 2$ 、 $\epsilon 3$ 、 $\epsilon 4$ と呼ぶ。下記「3 つの ApoE アイソフォームを形成する対立遺伝子の組み合わせ」と「ApoE 遺伝子型」は、第 1 章 1-2 対象と方法 4 に記載しているものと同じである。

3 つの ApoE アイソフォームを形成する対立遺伝子の組み合わせ ;

対立遺伝子 (isoform)	rs429358	rs7412
$\epsilon 2$ (ApoE2)	T (Cys)	T (Cys)
$\epsilon 3$ (ApoE3)	T (Cys)	C (Arg)
$\epsilon 4$ (ApoE4)	C (Arg)	C (Arg)

ApoE 遺伝子型 ;

	rs429358- rs7412	rs429358- rs7412
$\epsilon 2 \epsilon 2$	T (Cys)- T (Cys)	T (Cys)- T (Cys)
$\epsilon 2 \epsilon 3$	T (Cys)- T (Cys)	T (Cys)- C (Arg)
$\epsilon 2 \epsilon 4$	T (Cys)- T (Cys)	C (Arg)- C (Arg)
$\epsilon 3 \epsilon 3$	T (Cys)- C (Arg)	T (Cys)- C (Arg)
$\epsilon 3 \epsilon 4$	T (Cys)- C (Arg)	C (Arg)- C (Arg)
$\epsilon 4 \epsilon 4$	C (Arg)- C (Arg)	C (Arg)- C (Arg)

3 つのアイソフォームのうち、ApoE4 のみがアルツハイマー病の有力危険因子とされている。

本研究に用いたサンプルのうち、各遺伝子型の人数は、

$\epsilon 2 \epsilon 2$: 2 人、 $\epsilon 2 \epsilon 3$: 92 人、 $\epsilon 2 \epsilon 4$: 14 人、 $\epsilon 3 \epsilon 3$: 877 人、 $\epsilon 3 \epsilon 4$: 396 人、 $\epsilon 4 \epsilon 4$: 83 人であった。

hNP 遺伝子単独でのアルツハイマー病との関連解析には、危険因子である $\epsilon 4$ を持たず、一番出現頻度が高い $\epsilon 3 \epsilon 3$ 遺伝子型の人を対象に行った。

4. 統計解析

hNP 遺伝子の各 SNP のヘテロ接合体頻度の観察値がハーディ・ワインベルグの平衡法則から期待される理論分布値を満たしているかどうかを χ^2 適合度検定により確認した。各 SNP における患者－健常対照者群間での遺伝子型頻度(Genotype frequency)や対立遺伝子型頻度 (Allele frequency) の比較を、2×2、2×3 の χ^2 独立性の検定にて行った。これら統計値の算出には SPSS software 11.0J (SPSS Japan Inc.)を用いた。有意水準は $p < 0.05$ とした。

結果

アルツハイマー病—健常対照群間比較関連解析

1. 全対象者による解析 (全てのApoEアイソフォームを含む)

疾患—健常対照群間比較に先立ち、ハーディ・ワインベルグ平衡検定を行った。その結果、健常対照者群および疾患群において、ハーディ・ワインベルグ平衡からの逸脱している SNPs は認められなかった。

各 SNPs についてアルツハイマー病患者—健常対照群間での遺伝子型頻度 (Genotype frequency : GF) および対立遺伝子頻度 (Allele frequency : AF) を集計し、 2×3 、 2×2 の χ^2 独立性の検定を行った。その結果、5'上流に位置する SNP4 と 3'下流に位置する SNP23 において、遺伝子型頻度 (GF)、対立遺伝子頻度 (AF) どちらにおいても有意な差が得られ (GF ; SNP4 $p=0.048$ 、SNP23 $p=0.048$ AF ; SNP4 $p=0.018$ 、SNP23 $p=0.018$)、各 SNPs のマイナーアレルがアルツハイマー病患者で有意に多いことが明らかとなった (表 5)。さらに、発症オッズ比を算出したところ、SNP4、SNP23 でのオッズ比はそれぞれ 1.22、1.23 であった。これは、各 SNP においてマイナーアレルを持っている人は、持っていない人に比べてアルツハイマー病罹患率が約 1.22 倍、1.23 倍高いことを示している (表 5)。

2. 対象者 : ApoE3 アイソフォームのみ持つ人 ($\epsilon 3 \epsilon 3$ 遺伝子型の人)

第 1 章 : 1-2 の結果でも述べたように、*hNP* 遺伝子の近傍にはアルツハイマー病発症に関わる危険因子の一つである *ApoE* 遺伝子が存在する。そして、*ApoE* の 3 つのアイソフォーム *ApoE2*、*ApoE3*、*ApoE4* のうち、*ApoE4* を形成する対立遺伝子 $\epsilon 4$ がアルツハイマー病発症リスクを上げる危険因子と考えられている。一方、*ApoE3* を形成する $\epsilon 3$ や *ApoE2* を形成する $\epsilon 2$ はアルツハイマー病発症に影響を及ぼさないことが明らかとなっている。そこで、上述のアルツハイマー病—健常対照群間比較で得られた有意な関連が、 $\epsilon 4$ の影響ではなく *hNP* 遺伝子単独のものであるかどうか検討するため、全対象者のうち *ApoE3* アイソフォームのみ持つ人 ($\epsilon 3 \epsilon 3$ 遺伝子型) を対象とし、再度同じ SNPs においてアルツハイマー病—健常対照群間比較関連解析を行った。 $\epsilon 3 \epsilon 3$ 遺伝子型であるアルツハイマー病患者は 346 人、健常者は 531 人であった。関連解析に先立ち、ハーディ・ワインベルグ平衡検定を行ったところ、健常対照

者群および疾患群において、ハーディ・ワインベルグ平衡からの逸脱している SNPs は認められなかった。

各 SNPs の遺伝子型を決定し、遺伝子型頻度 (Genotype frequency : GF) および対立遺伝子頻度 (Allele frequency : AF) を集計し、 2×3 、 2×2 の χ^2 独立性の検定を行ったところ、表 5 で見られた有意な差は消失し、*hNP* 遺伝子単独でのアルツハイマー病との関連は見出せなかった (表 6)。

考察

本研究第2章では、進行性の記憶障害、認知機能障害を主徴とし、多因子疾患であるアルツハイマー病と *hNP* 遺伝子との関連性を、SNPs を用いた患者-健常対照群間比較関連解析により検討した。その結果、SNP4 (5'上流) と SNP23 (3'下流) において、各 SNPs のマイナーアレルがアルツハイマー病患者で有意に多く出現していることが明らかとなった。しかし、これら有意な関連が、*hNP* 遺伝子の近距離に局在し、アルツハイマー病の発症危険因子である *ApoE* 遺伝子の影響を反映したものである可能性が強いことがわかり、*hNP* 遺伝子単独でのアルツハイマー病との関連は本研究においては証明できなかった。アルツハイマー病の発症メカニズムの解明は、異常構造物の沈着という明らかな分子病態があることから精神疾患と比べて進んでいるが、多因子疾患であることから、*ApoE* 遺伝子のような有力な危険因子以外に、複数の寄与率の低い未解明危険因子の存在が考えられる。このことから、今後、検体数を増やしての *hNP* 遺伝子とアルツハイマー病との再検討および異なった集団での追試は意義あることと考える。

第1章序論で述べたように NP 欠損マウスおよびヘテロマウスにおいて記憶力の低下が確認されている。また、*hNP* の機能の一つとして、細胞外マトリックス蛋白などをプロセシングすることが明らかとなっている(Rajapakse et al., 2005)。これらのことから、*hNP* 遺伝子の異常、特に発現減少が、 $A\beta$ 形成や神経原繊維変化による異常構造物形成の促進などに関わり、神経細胞死や萎縮を進め、記憶障害が見られるアルツハイマー病の発症・進行に関与している可能性が考えられる。一方で、アルツハイマー病患者の海馬で、*hNP* mRNA の発現が10倍以上も上昇しているという報告がある(Shimizu-Okabe C, 2001)。この発現上昇は、アルツハイマー病発症の原因もしくは結果、両方の可能性が考えられるが、過剰量の *hNP* は記憶・学習機能を大きく阻害することを示唆しており、マウス海馬に、NP リコンビナント蛋白質を過剰に投与した実験において、シナプス伝達効率が抑圧 (LTD) される結果とよく一致している。このことから、アルツハイマー病患者脳でみられる記憶力の低下は、*hNP* 遺伝子の過剰発現が一因となっている可能性が考え得る。

本研究においては、*hNP* 遺伝子とアルツハイマー病との関連は見出されなかったが、今後、検体数を増やした追試の患者-健常対照群間比較関連解析に加え、*hNP* 遺伝子と近距離に存在することによる *ApoE* 遺伝子との相乗効果の検討、さらには *hNP* 遺伝子そのものの機能解析および *hNP* の発現量に注目したアルツハイマー病発症との関連解析を行うことは大変意義あることと考えられ、アルツハイマー病の新たな発症メカニズムの解明につながると期待される。

謝辞

本研究を行う素晴らしい機会を与えて下さり、研究遂行にあたり温かく見守って下さいました奈良先端科学技術大学院大学細胞構造学講座 塩坂貞夫 教授に心から深く感謝御礼申し上げます。

共同研究として本研究の解析対象となった検体を御提供下さり、また研究の場も快く与えて頂き、研究全般にわたり御指導ならびに御鞭撻を賜りました国立精神・神経センター疾病研究第三部 功刀浩 部長に心から深く感謝御礼申し上げます。

本研究の遂行に当たり、多大なるご援助賜りました国立精神・神経センター疾病研究第三部 橋本亮太 室長（現 大阪大学大学院医学研究科付属子どものこころの分子統御機構研究センター 疾患関連分子解析部門・精神医学 特任准教授）に心から深く感謝御礼申し上げます。

本研究に欠かせないゲノムリソースを快く分けてくださいました、国立精神・神経センター病院 斉藤治 先生、有馬邦正 先生、理化学研究所精神疾患動態研究チーム 加藤忠史 先生、昭和大学医学部精神医学教室 上島国利 先生、巽雅彦 先生、小菅麻子 先生、筑波大学臨床医学系精神医学 朝田隆 先生に心から深く感謝御礼申し上げます。

ラット脳組織初代培養方法など直接ご指導下さり、研究の進め方や取り組む姿勢など惜しみなく教えて頂き、公私ともにいつも励まして下さいました国立精神・神経センター疾病研究第三部 沼川忠広 室長に深く心から感謝御礼申し上げます。

公私にわたりいつも惜しみ無く助言を下さり、本研究の主要テーマであります遺伝統計学について何度も質問をする私に優しく丁寧に教えて下さり、また論文作成においても多大なるご指導して下さいました国立精神・神経センター疾病研究第三部 飯嶋良味 研究員に心から感謝するとともに厚く御礼申し上げます。

本研究遂行にあたり、実験原理から丁寧に教えて下さり、確かな実験方法を直接ご指導頂きました国立精神・神経センター疾病研究第三部 岡田武也 研究員に心から感謝御礼申し上げます。

研究生活において、いつも気にかけてくださり、親身になってご助言くださいました国立精神・神経センター疾病研究第三部 熊丸絵美 研究員、安達直樹 研究員に心から感謝御礼申し上げます。

直接ご指導もして頂き、研究報告会の度にご助言下さいました、奈良先端科学技術大学院大学 石川保幸 助教に心から感謝御礼申し上げます。

動物実験を行う際に、多大なるご指導と共にサポートして下さいました、国立精神・神経センター疾病研究第三部 古田都 研究員（現 聖マリアンナ医科大学生理学教室 助教）、千葉秀一 研究員、早稲田大学大学院先進理工学研究科 修士課程学生 梶山優氏、二宮碧氏に心から感謝御礼申し上げます。

研究生活を支えてくださいました、国立精神・神経センター疾病研究第三部 秘書

の重盛さん、板谷さん、渡邊さん、白澤さん、研究員の皆様、実験助手の皆様、奈良先端科学技術大学院大学の先輩、同期、後輩の皆様から心から感謝御礼申し上げます。
最後に、ずっと応援してくれていた両親に心から感謝申し上げます、ありがとう。

参考文献

Abelson, J.F., Kwan, K.Y., O'Roak, B.J., Baek, D.Y., Stillman, A.A., Morgan, T.M., Mathews, C.A., Pauls, D.L., Rasin, M.R., Gunel, M., *et al.* (2005). Sequence variants in SLITRK1 are associated with Tourette's syndrome. *Science (New York, NY)* 310, 317-320.

Allen, M.G. (1976). Twin studies of affective illness. *Arch Gen Psychiatry* 33, 1476-1478.

Andersen, P., and Soleng, A.F. (1998). Long-term potentiation and spatial training are both associated with the generation of new excitatory synapses. *Brain research* 26, 353-359.

Arinami, T., Ohtsuki, T., Ishiguro, H., Ujike, H., Tanaka, Y., Morita, Y., Mineta, M., Takeichi, M., Yamada, S., Imamura, A., *et al.* (2005). Genomewide high-density SNP linkage analysis of 236 Japanese families supports the existence of schizophrenia susceptibility loci on chromosomes 1p, 14q, and 20p. *Am J Hum Genet* 77, 937-944.

Arolt, V., Lencer, R., Nolte, A., Muller-Myhsok, B., Purmann, S., Schurmann, M., Leutelt, J., Pinnow, M., and Schwinger, E. (1996). Eye tracking dysfunction is a putative phenotypic susceptibility marker of schizophrenia and maps to a locus on chromosome 6p in families with multiple occurrence of the disease. *Am J Med Genet* 67, 564-579.

Badenhop, R.F., Moses, M.J., Scimone, A., Mitchell, P.B., Ewen-White, K.R., Rosso, A., Donald, J.A., Adams, L.J., and Schofield, P.R. (2002). A genome screen of 13 bipolar affective disorder pedigrees provides evidence for susceptibility loci on chromosome 3 as well as chromosomes 9, 13 and 19. *Molecular psychiatry* 7, 851-859.

Barch, D.M., Sheline, Y.I., Csernansky, J.G., and Snyder, A.Z. (2003). Working memory and prefrontal cortex dysfunction: specificity to schizophrenia compared with major depression. *Biol Psychiatry* 53, 376-384.

Barrett, J.C., Fry, B., Maller, J., and Daly, M.J. (2005). Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics (Oxford, England)* 21, 263-265.

Bauer, M., Alda, M., Priller, J., and Young, L.T. (2003). Implications of the neuroprotective effects of lithium for the treatment of bipolar and neurodegenerative disorders. *Pharmacopsychiatry* 36 Suppl 3, S250-254.

Bearden, C.E., Thompson, P.M., Dalwani, M., Hayashi, K.M., Lee, A.D., Nicoletti, M.,

Trakhtenbroit, M., Glahn, D.C., Brambilla, P., Sassi, R.B., *et al.* (2007). Greater cortical gray matter density in lithium-treated patients with bipolar disorder. *Biol Psychiatry* 62, 7-16.

Beneyto, M., Kristiansen, L.V., Oni-Orisan, A., McCullumsmith, R.E., and Meador-Woodruff, J.H. (2007). Abnormal glutamate receptor expression in the medial temporal lobe in schizophrenia and mood disorders. *Neuropsychopharmacology* 32, 1888-1902.

Berrettini, W. (2003). Evidence for shared susceptibility in bipolar disorder and schizophrenia. *American journal of medical genetics* 123C, 59-64.

Borchelt, D.R., Thinakaran, G., Eckman, C.B., Lee, M.K., Davenport, F., Ratovitsky, T., Prada, C.M., Kim, G., Seekins, S., Yager, D., *et al.* (1996). Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron* 17, 1005-1013.

Bremner, J.D., Narayan, M., Anderson, E.R., Staib, L.H., Miller, H.L., and Charney, D.S. (2000). Hippocampal volume reduction in major depression. *Am J Psychiatry* 157, 115-118.

Bruno, S., Papadopoulou, K., Cercignani, M., Cicolotti, L., Ron, A. (2006). Structural brain correlates of IQ changes in bipolar disorder *Psychological Medicine* CAMBRIDGE JOURNALS.

Cannon, T.D., Huttunen, M.O., Lonnqvist, J., Tuulio-Henriksson, A., Pirkola, T., Glahn, D., Finkelstein, J., Hietanen, M., Kaprio, J., and Koskenvuo, M. (2000). The inheritance of neuropsychological dysfunction in twins discordant for schizophrenia. *Am J Hum Genet* 67, 369-382.

Cardno, A.G., Marshall, E.J., Coid, B., Macdonald, A.M., Ribchester, T.R., Davies, N.J., Venturi, P., Jones, L.A., Lewis, S.W., Sham, P.C., *et al.* (1999). Heritability estimates for psychotic disorders: the Maudsley twin psychosis series. *Archives of general psychiatry* 56, 162-168.

Chakravarti, A. (1999). Population genetics--making sense out of sequence. *Nat Genet* 21, 56-60.

Chen, J.M., Ferec, C., and Cooper, D.N. (2006). A systematic analysis of disease-associated variants in the 3' regulatory regions of human protein-coding genes I: general principles and overview. *Human genetics* 120, 1-21.

Chen, Z.L., Yoshida, S., Kato, K., Momota, Y., Suzuki, J., Tanaka, T., Ito, J., Nishino, H.,

Aimoto, S., Kiyama, H., *et al.* (1995). Expression and activity-dependent changes of a novel limbic-serine protease gene in the hippocampus. *J Neurosci* *15*, 5088-5097.

Cheng, M.C., and Chen, C.H. (2007). Identification of rare mutations of synaptogyrin 1 gene in patients with schizophrenia. *J Psychiatr Res* *41*, 1027-1031.

Chuzhanova, N., Cooper, D.N., Ferec, C., and Chen, J.M. (2007). Searching for potential microRNA-binding site mutations amongst known disease-associated 3' UTR variants. *Genomic medicine* *1*, 29-33.

Conklin, H.M., Curtis, C.E., Katsanis, J., and Iacono, W.G. (2000). Verbal working memory impairment in schizophrenia patients and their first-degree relatives: evidence from the digit span task. *Am J Psychiatry* *157*, 275-277.

Craddock, N., and Jones, I. (1999). Genetics of bipolar disorder. *Journal of medical genetics* *36*, 585-594.

D'Sa, C., and Duman, R.S. (2002). Antidepressants and neuroplasticity. *Bipolar Disord* *4*, 183-194.

Daban, C., Martinez-Aran, A., Torrent, C., Tabares-Seisdedos, R., Balanza-Martinez, V., Salazar-Fraile, J., Selva-Vera, G., and Vieta, E. (2006). Specificity of cognitive deficits in bipolar disorder versus schizophrenia. A systematic review. *Psychotherapy and psychosomatics* *75*, 72-84.

Davis, R.L., Shrimpton, A.E., Holohan, P.D., Bradshaw, C., Feiglin, D., Collins, G.H., Sonderegger, P., Kinter, J., Becker, L.M., Lachawan, F., *et al.* (1999). Familial dementia caused by polymerization of mutant neuroserpin. *Nature* *401*, 376-379.

De Strooper, B., Saftig, P., Craessaerts, K., Vanderstichele, H., Guhde, G., Annaert, W., Von Figura, K., and Van Leuven, F. (1998). Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* *391*, 387-390.

Detera-Wadleigh, S.D., and McMahon, F.J. (2006). G72/G30 in schizophrenia and bipolar disorder: review and meta-analysis. *Biol Psychiatry* *60*, 106-114.

Du, J., Gray, N.A., Falke, C.A., Chen, W., Yuan, P., Szabo, S.T., Einat, H., and Manji, H.K. (2004). Modulation of synaptic plasticity by antimanic agents: the role of AMPA glutamate receptor subunit 1 synaptic expression. *J Neurosci* *24*, 6578-6589.

Dudbridge, F., Koeleman, B.P., Todd, J.A., and Clayton, D.G. (2000). Unbiased application of the transmission/disequilibrium test to multilocus haplotypes. *Am J Hum Genet* 66, 2009-2012.

Duman, R.S., Nakagawa, S., and Malberg, J. (2001). Regulation of adult neurogenesis by antidepressant treatment. *Neuropsychopharmacology* 25, 836-844.

Farmer, A., Elkin, A., and McGuffin, P. (2007). The genetics of bipolar affective disorder. *Curr Opin Psychiatry* 20, 8-12.

Ferreira, M.A., O'Donovan, M.C., Meng, Y.A., Jones, I.R., Ruderfer, D.M., Jones, L., Fan, J., Kirov, G., Perlis, R.H., Green, E.K., *et al.* (2008). Collaborative genome-wide association analysis supports a role for ANK3 and CACNA1C in bipolar disorder. *Nat Genet*.

Fifkova, E. (1985). A possible mechanism of morphometric changes in dendritic spines induced by stimulation. *Cell Mol Neurobiol* 5, 47-63.

Frey, U., Muller, M., and Kuhl, D. (1996). A different form of long-lasting potentiation revealed in tissue plasminogen activator mutant mice. *J Neurosci* 16, 2057-2063.

Gabriel, S.B., Schaffner, S.F., Nguyen, H., Moore, J.M., Roy, J., Blumenstiel, B., Higgins, J., DeFelice, M., Lochner, A., Faggart, M., *et al.* (2002). The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science (New York, NY)* 296, 2225-2229.

Gan, L., Lee, I., Smith, R., Argonza-Barrett, R., Lei, H., McCuaig, J., Moss, P., Paeper, B., and Wang, K. (2000). Sequencing and expression analysis of the serine protease gene cluster located in chromosome 19q13 region. *Gene* 257, 119-130.

Gershon, E.S., Hamovit, J., Guroff, J.J., Dibble, E., Leckman, J.F., Sceery, W., Targum, S.D., Nurnberger, J.I., Jr., Goldin, L.R., and Bunney, W.E., Jr. (1982). A family study of schizoaffective, bipolar I, bipolar II, unipolar, and normal control probands. *Archives of general psychiatry* 39, 1157-1167.

Geyer, M.A., McIlwain, K.L., and Paylor, R. (2002). Mouse genetic models for prepulse inhibition: an early review. *Molecular psychiatry* 7, 1039-1053.

Glahn, D.C., Bearden, C.E., Niendam, T.A., and Escamilla, M.A. (2004). The feasibility of neuropsychological endophenotypes in the search for genes associated with bipolar affective disorder. *Bipolar Disord* 6, 171-182.

Glahn, D.C., Therman, S., Manninen, M., Huttunen, M., Kaprio, J., Lonqvist, J., and Cannon, T.D. (2003). Spatial working memory as an endophenotype for schizophrenia. *Biol Psychiatry* 53, 624-626.

Glantz, L.A., and Lewis, D.A. (2000). Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical pyramidal neurons in schizophrenia. *Archives of general psychiatry* 57, 65-73.

Goate, A., Chartier-Harlin, M.C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L., *et al.* (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349, 704-706.

Grimwood, J., Gordon, L.A., Olsen, A., Terry, A., Schmutz, J., Lamerdin, J., Hellsten, U., Goodstein, D., Couronne, O., Tran-Gyamfi, M., *et al.* (2004). The DNA sequence and biology of human chromosome 19. *Nature* 428, 529-535.

Hao, Y., Creson, T., Zhang, L., Li, P., Du, F., Yuan, P., Gould, T.D., Manji, H.K., and Chen, G. (2004). Mood stabilizer valproate promotes ERK pathway-dependent cortical neuronal growth and neurogenesis. *J Neurosci* 24, 6590-6599.

Harvey, T.J., Hooper, J.D., Myers, S.A., Stephenson, S.A., Ashworth, L.K., and Clements, J.A. (2000). Tissue-specific expression patterns and fine mapping of the human kallikrein (KLK) locus on proximal 19q13.4. *The Journal of biological chemistry* 275, 37397-37406.

Heston, L.L. (1966). Psychiatric disorders in foster home reared children of schizophrenic mothers. *Br J Psychiatry* 112, 819-825.

Hirayasu, Y., Tanaka, S., Shenton, M.E., Salisbury, D.F., DeSantis, M.A., Levitt, J.J., Wible, C., Yurgelun-Todd, D., Kikinis, R., Jolesz, F.A., *et al.* (2001). Prefrontal gray matter volume reduction in first episode schizophrenia. *Cereb Cortex* 11, 374-381.

Horii, Y., Yamasaki, N., Miyakawa, T., and Shiosaka, S. (2008). Increased anxiety-like behavior in neuropsin (kallikrein-related peptidase 8) gene-deficient mice. *Behav Neurosci* 122, 498-504.

Huang, Y.Y., Bach, M.E., Lipp, H.P., Zhuo, M., Wolfer, D.P., Hawkins, R.D., Schoonjans, L., Kandel, E.R., Godfraind, J.M., Mulligan, R., *et al.* (1996). Mice lacking the gene encoding tissue-type plasminogen activator show a selective interference with late-phase long-term potentiation in both Schaffer collateral and mossy fiber pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 8699-8704.

Ishikawa, Y., Horii, Y., Tamura, H., and Shiosaka, S. (2008). Neuropsin (KLK8)-dependent and -independent synaptic tagging in the Schaffer-collateral pathway of mouse hippocampus. *J Neurosci* 28, 843-849.

Kendler, K.S., Heath, A.C., Neale, M.C., Kessler, R.C., and Eaves, L.J. (1992). A population-based twin study of alcoholism in women. *JAMA* 268, 1877-1882.

Kirov, G., Zaharieva, I., Georgieva, L., Moskvina, V., Nikolov, I., Cichon, S., Hillmer, A., Toncheva, D., Owen, M.J., and O'Donovan, M.C. (2008). A genome-wide association study in 574 schizophrenia trios using DNA pooling. *Molecular psychiatry*.

Koch, W., Ehrenhaft, A., Griesser, K., Pfeufer, A., Muller, J., Schomig, A., and Kastrati, A. (2002). TaqMan systems for genotyping of disease-related polymorphisms present in the gene encoding apolipoprotein E. *Clin Chem Lab Med* 40, 1123-1131.

Komai, S., Matsuyama, T., Matsumoto, K., Kato, K., Kobayashi, M., Imamura, K., Yoshida, S., Ugawa, S., and Shiosaka, S. (2000). Neuropsin regulates an early phase of schaffer-collateral long-term potentiation in the murine hippocampus. *The European journal of neuroscience* 12, 1479-1486.

Lenox, R.H., Gould, T.D., and Manji, H.K. (2002). Endophenotypes in bipolar disorder. *Am J Med Genet* 114, 391-406.

Leonard, S., Gault, J., Hopkins, J., Logel, J., Vianzon, R., Short, M., Drebing, C., Berger, R., Venn, D., Sirota, P., *et al.* (2002). Association of promoter variants in the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor subunit gene with an inhibitory deficit found in schizophrenia. *Archives of general psychiatry* 59, 1085-1096.

Levy-Lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., Romano, D.M., Oshima, J., Pettingell, W.H., Yu, C.E., Jondro, P.D., Schmidt, S.D., Wang, K., *et al.* (1995). Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science (New York, NY)* 269, 973-977.

Li, D., Collier, D.A., and He, L. (2006). Meta-analysis shows strong positive association of the neuregulin 1 (NRG1) gene with schizophrenia. *Hum Mol Genet* 15, 1995-2002.

Li, D., and He, L. (2007). Association study between the dystrobrevin binding protein 1 gene (DTNBP1) and schizophrenia: a meta-analysis. *Schizophr Res* 96, 112-118.

Li, Y., Qian, Y.P., Yu, X.J., Wang, Y.Q., Dong, D.G., Sun, W., Ma, R.M., and Su, B. (2004).

Recent origin of a hominoid-specific splice form of neuropsin, a gene involved in learning and memory. *Molecular biology and evolution* 21, 2111-2115.

Lu, Z.X., Peng, J., and Su, B. (2007). A human-specific mutation leads to the origin of a novel splice form of neuropsin (KLK8), a gene involved in learning and memory. *Human mutation* 28, 978-984.

Macgregor, S., Visscher, P.M., Knott, S.A., Thomson, P., Porteous, D.J., Millar, J.K., Devon, R.S., Blackwood, D., and Muir, W.J. (2004). A genome scan and follow-up study identify a bipolar disorder susceptibility locus on chromosome 1q42. *Molecular psychiatry* 9, 1083-1090.

MacQueen, G.M., Campbell, S., McEwen, B.S., Macdonald, K., Amano, S., Joffe, R.T., Nahmias, C., and Young, L.T. (2003). Course of illness, hippocampal function, and hippocampal volume in major depression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 1387-1392.

Magklara, A., Scorilas, A., Katsaros, D., Massobrio, M., Yousef, G.M., Fracchioli, S., Danese, S., and Diamandis, E.P. (2001). The human KLK8 (neuropsin/ovasin) gene: identification of two novel splice variants and its prognostic value in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 7, 806-811.

Manji, H.K., Moore, G.J., and Chen, G. (2000). Lithium up-regulates the cytoprotective protein Bcl-2 in the CNS in vivo: a role for neurotrophic and neuroprotective effects in manic depressive illness. *The Journal of clinical psychiatry* 61 Suppl 9, 82-96.

Marcelis, M., Suckling, J., Woodruff, P., Hofman, P., Bullmore, E., and van Os, J. (2003). Searching for a structural endophenotype in psychosis using computational morphometry. *Psychiatry Res* 122, 153-167.

Matsumoto-Miyai, K., Ninomiya, A., Yamasaki, H., Tamura, H., Nakamura, Y., and Shiosaka, S. (2003). NMDA-dependent proteolysis of presynaptic adhesion molecule L1 in the hippocampus by neuropsin. *J Neurosci* 23, 7727-7736.

McDonald, C., Zanelli, J., Rabe-Hesketh, S., Ellison-Wright, I., Sham, P., Kalidindi, S., Murray, R.M., and Kennedy, N. (2004). Meta-analysis of magnetic resonance imaging brain morphometry studies in bipolar disorder. *Biol Psychiatry* 56, 411-417.

Mendlewicz, J., and Rainer, J.D. (1977). Adoption study supporting genetic transmission in

manic--depressive illness. *Nature* 268, 327-329.

Meyer, J., Johannssen, K., Freitag, C.M., Schraut, K., Teuber, I., Hahner, A., Mainhardt, C., Mossner, R., Volz, H.P., Wienker, T.F., *et al.* (2005). Rare variants of the gene encoding the potassium chloride co-transporter 3 are associated with bipolar disorder. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)* 8, 495-504.

Michikawa, M., and Yanagisawa, K. (1998). Apolipoprotein E4 induces neuronal cell death under conditions of suppressed de novo cholesterol synthesis. *J Neurosci Res* 54, 58-67.

Mitsui, S., Tsuruoka, N., Yamashiro, K., Nakazato, H., and Yamaguchi, N. (1999). A novel form of human neuropsin, a brain-related serine protease, is generated by alternative splicing and is expressed preferentially in human adult brain. *European journal of biochemistry / FEBS* 260, 627-634.

Miyata, M., and Smith, J.D. (1996). Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and beta-amyloid peptides. *Nat Genet* 14, 55-61.

Molinari, F., Rio, M., Meskenaite, V., Encha-Razavi, F., Auge, J., Bacq, D., Briault, S., Vekemans, M., Munnich, A., Attie-Bitach, T., *et al.* (2002). Truncating neurotrypsin mutation in autosomal recessive nonsyndromic mental retardation. *Science (New York, NY)* 298, 1779-1781.

Moser, D., Ekawardhani, S., Kumsta, R., Palmason, H., Bock, C., Athanassiadou, Z., Lesch, K.P., and Meyer, J. (2008). Functional Analysis of a Potassium-Chloride Co-Transporter 3 (SLC12A6) Promoter Polymorphism Leading to an Additional DNA Methylation Site. *Neuropsychopharmacology*.

Moskvina, V., Craddock, N., Holmans, P., Nikolov, I., Pahwa, J.S., Green, E., Owen, M.J., and O'Donovan, M.C. (2008). Gene-wide analyses of genome-wide association data sets: evidence for multiple common risk alleles for schizophrenia and bipolar disorder and for overlap in genetic risk. *Molecular psychiatry*.

Nurnberger, J., J., L. Goldin, and E. Gershon. (1986). *Genetics of psychiatric disorders*. WB Saunders, Philadelphia, 486-521.

Nurnberger, J.a.E.G. (1992). *Genetics* Churchill Livingstone, Edinburgh., 131-147.

O'Donovan, M.C., Craddock, N., Norton, N., Williams, H., Peirce, T., Moskvina, V., Nikolov, I., Hamshere, M., Carroll, L., Georgieva, L., *et al.* (2008). Identification of loci associated with schizophrenia by genome-wide association and follow-up. *Nat Genet.*

Okabe, A., Momota, Y., Yoshida, S., Hirata, A., Ito, J., Nishino, H., and Shiosaka, S. (1996). Kindling induces neuropsin mRNA in the mouse brain. *Brain Res* 728, 116-120.

Ostroff, L.E., Fiala, J.C., Allwardt, B., and Harris, K.M. (2002). Polyribosomes redistribute from dendritic shafts into spines with enlarged synapses during LTP in developing rat hippocampal slices. *Neuron* 35, 535-545.

Pang, P.T., Teng, H.K., Zaitsev, E., Woo, N.T., Sakata, K., Zhen, S., Teng, K.K., Yung, W.H., Hempstead, B.L., and Lu, B. (2004). Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science (New York, NY)* 306, 487-491.

Pierri, J.N., Volk, C.L., Auh, S., Sampson, A., and Lewis, D.A. (2001). Decreased somal size of deep layer 3 pyramidal neurons in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *Archives of general psychiatry* 58, 466-473.

Qian, Z., Gilbert, M.E., Colicos, M.A., Kandel, E.R., and Kuhl, D. (1993). Tissue-plasminogen activator is induced as an immediate-early gene during seizure, kindling and long-term potentiation. *Nature* 361, 453-457.

Rajapakse, S., Ogiwara, K., Takano, N., Moriyama, A., and Takahashi, T. (2005). Biochemical characterization of human kallikrein 8 and its possible involvement in the degradation of extracellular matrix proteins. *FEBS Lett* 579, 6879-6884.

Reich, D.E., Cargill, M., Bolk, S., Ireland, J., Sabeti, P.C., Richter, D.J., Lavery, T., Kouyoumjian, R., Farhadian, S.F., Ward, R., *et al.* (2001). Linkage disequilibrium in the human genome. *Nature* 411, 199-204.

Reich, D.E., and Lander, E.S. (2001). On the allelic spectrum of human disease. *Trends Genet* 17, 502-510.

Rinaldi, T., Kulangara, K., Antonello, K., and Markram, H. (2007). Elevated NMDA receptor levels and enhanced postsynaptic long-term potentiation induced by prenatal exposure to valproic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 13501-13506.

Rogaev, E.I., Sherrington, R., Rogaeva, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Liang, Y., Chi, H., Lin, C., Holman, K., Tsuda, T., *et al.* (1995). Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* 376, 775-778.

Rogaeva, E., Meng, Y., Lee, J.H., Gu, Y., Kawarai, T., Zou, F., Katayama, T., Baldwin, C.T., Cheng, R., Hasegawa, H., *et al.* (2007). The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat Genet* 39, 168-177.

Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D., George-Hyslop, P.H., Pericak-Vance, M.A., Joo, S.H., Rosi, B.L., Gusella, J.F., Crapper-MacLachlan, D.R., Alberts, M.J., *et al.* (1993). Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 43, 1467-1472.

Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Bird, T.D., Hardy, J., Hutton, M., Kukull, W., *et al.* (1996). Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med* 2, 864-870.

Schretlen, D.J., Cascella, N.G., Meyer, S.M., Kingery, L.R., Testa, S.M., Munro, C.A., Pulver, A.E., Rivkin, P., Rao, V.A., Diaz-Asper, C.M., *et al.* (2007). Neuropsychological functioning in bipolar disorder and schizophrenia. *Biol Psychiatry* 62, 179-186.

Sheline, Y.I., Sanghavi, M., Mintun, M.A., and Gado, M.H. (1999). Depression duration but not age predicts hippocampal volume loss in medically healthy women with recurrent major depression. *J Neurosci* 19, 5034-5043.

Sherrington, R., Rogaev, E.I., Liang, Y., Rogaeva, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K., *et al.* (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375, 754-760.

Shim, S.S., Hammonds, M.D., Ganocy, S.J., and Calabrese, J.R. (2007). Effects of sub-chronic lithium treatment on synaptic plasticity in the dentate gyrus of rat hippocampal slices. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 31, 343-347.

Shimizu-Okabe C, Y.G., Diamandis EP, Yoshida S, Shiosaka S, Fahnstock M. (2001). Expression of the kallikrein gene family in normal and Alzheimer's disease brain. *Neuroreport* 12, 2747-2751.

Shimizu, C., Yoshida, S., Shibata, M., Kato, K., Momota, Y., Matsumoto, K., Shiosaka, T., Midorikawa, R., Kamachi, T., Kawabe, A., *et al.* (1998). Characterization of recombinant and brain neuropsin, a plasticity-related serine protease. *The Journal of biological chemistry* 273, 11189-11196.

Shinagawa, F., Kobayashi, S., Fujita, K., and Maekawa, H. (1990). Japanese Wechsler Adult Intelligence Scale-Revised. Nihonbunkakagakusha: Tokyo (in Japanese).

Sitskoorn, M.M., Aleman, A., Ebisch, S.J., Appels, M.C., and Kahn, R.S. (2004). Cognitive deficits in relatives of patients with schizophrenia: a meta-analysis. *Schizophr Res* 71, 285-295.

Strittmatter, W.J., Saunders, A.M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G.S., and Roses, A.D. (1993a). Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 1977-1981.

Strittmatter, W.J., Weisgraber, K.H., Huang, D.Y., Dong, L.M., Salvesen, G.S., Pericak-Vance, M., Schmechel, D., Saunders, A.M., Goldgaber, D., and Roses, A.D. (1993b). Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 8098-8102.

Sugishita, M. (2001). Japanese Wechsler Memory Scale-Revised. Nihonbunkakagakusha: Tokyo (in Japanese).

Suzuki, J., Yoshida, S., Chen, Z.L., Momota, Y., Kato, K., Hirata, A., and Shiosaka, S. (1995). Ontogeny of neuropsin mRNA expression in the mouse brain. *Neuroscience research* 23, 345-351.

Tamura, H., Ishikawa, Y., Hino, N., Maeda, M., Yoshida, S., Kaku, S., and Shiosaka, S. (2006). Neuropsin is essential for early processes of memory acquisition and Schaffer collateral long-term potentiation in adult mouse hippocampus in vivo. *The Journal of physiology* 570, 541-551.

Teesalu, T., Kulla, A., Simisker, A., Siren, V., Lawrence, D.A., Asser, T., and Vaheri, A. (2004). Tissue plasminogen activator and neuroserpin are widely expressed in the human central nervous system. *Thrombosis and haemostasis* 92, 358-368.

Theuns, J., Marjaux, E., Vandenbulcke, M., Van Laere, K., Kumar-Singh, S., Bormans, G., Brouwers, N., Van den Broeck, M., Vennekens, K., Corsmit, E., *et al.* (2006). Alzheimer dementia caused by a novel mutation located in the APP C-terminal intracytosolic fragment. *Human mutation* 27, 888-896.

Thiselton, D.L., Vladimirov, V.I., Kuo, P.H., McClay, J., Wormley, B., Fanous, A., O'Neill, F.A., Walsh, D., Van den Oord, E.J., Kendler, K.S., *et al.* (2008). AKT1 is associated with schizophrenia across multiple symptom dimensions in the Irish study of high density schizophrenia families. *Biol Psychiatry* 63, 449-457.

Tienari, P. (1991). Interaction between genetic vulnerability and family environment: the Finnish adoptive family study of schizophrenia. *Acta psychiatrica Scandinavica* 84, 460-465.

Toyota, T., Yamada, K., Detera-Wadleigh, S.D., and Yoshikawa, T. (2003). Analysis of a cluster of polymorphisms in AKT1 gene in bipolar pedigrees: a family-based association study. *Neuroscience letters* 339, 5-8.

Verma, R., Kubendran, S., Das, S.K., Jain, S., and Brahmachari, S.K. (2005a). SYNGR1 is associated with schizophrenia and bipolar disorder in southern India. *Journal of human genetics* 50, 635-640.

Verma, R., Mukerji, M., Grover, D., C, B.R., Das, S.K., Kubendran, S., Jain, S., and Brahmachari, S.K. (2005b). MLC1 gene is associated with schizophrenia and bipolar disorder in Southern India. *Biol Psychiatry* 58, 16-22.

Wechsler, D. (1981). Wechsler Adult Intelligence Scale, Revised. Psychological Corporation: New York.

Wechsler, D. (1987). Wechsler Memory Scale Manual, Revised. Psychological Corporation: San Antonio.

Weinberger, D.R., Berman, K.F., and Zec, R.F. (1986). Physiologic dysfunction of dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia. I. Regional cerebral blood flow evidence. *Archives of general psychiatry* 43, 114-124.

Williams, R.S., Cheng, L., Mudge, A.W., and Harwood, A.J. (2002). A common mechanism of action for three mood-stabilizing drugs. *Nature* 417, 292-295.

Yoshida, S., and Shiosaka, S. (1999). Plasticity-related serine proteases in the brain (review).

Int J Mol Med 3, 405-409.

Yoshida, S., Taniguchi, M., Hirata, A., and Shiosaka, S. (1998). Sequence analysis and expression of human neuropsin cDNA and gene. *Gene* 213, 9-16.

Yuste, R., and Bonhoeffer, T. (2001). Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annual review of neuroscience* 24, 1071-1089.

氏家, 寛. (2000). 臨床精神医学講座 S11 精神疾患と遺伝. 中山書店, 東京, 253-272.

有波, 忠. (2003). 特集 精神疾患の分子医学 ここまで進んだ病因の解明 統合失調症-遺伝研究. *Molecular Medicine* 40, 262-269.

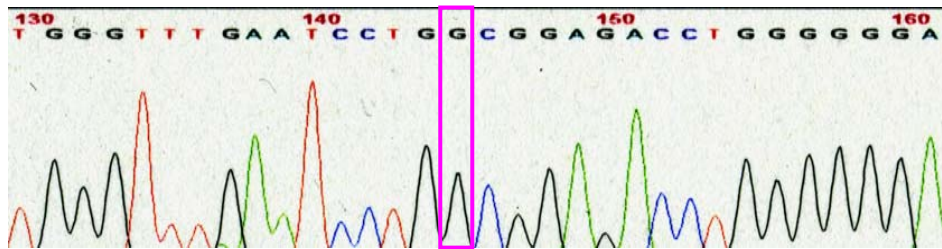
図表

表 1 : SNPs 検索に使用したプライマー

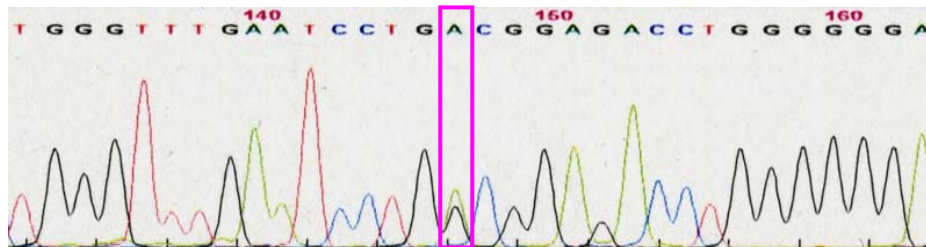
Primer No.	Target region		Location on		Identified SNP
			Chromosome 9		
			5'→ 3'		
1	5' flanking region	F	AACTTTGCCAGTGGGACTT	56197848-56197829	
		R	GTCAGAAACCAGAGGGTGGGA	56197306-56197287	
2	5' flanking region	F	CGGGAAACCTCACCTTCTTT	56197592-56197573	1,2
		R	CTGCTAGGGGCCAGGACT	56197112-56197096	
3	5' flanking region	F	TTCTTCGGTCCCGGTTACT	56197270-56197251	3,4
		R	CTGCCTGGTACACGATTCTG	56196690-56196671	
4	exon1	F	CCCTCCTCCCTCAAGATTC	56196835-56196816	5
		R	CCAGACTGCTGGATCTCGAC	56196510-56196491	
5	intron1	F	GGGTCCGAATCAGTAGGTGA	56196641-56196622	
		R	GAGCAGGAACATCCACGTCT	56196207-56196198	
6	exon2	F	CAGTGCCCAAATCCAGAACT	56196317-56196298	
		R	CACTGCTGCCTTCAGATCC	56196132-56196114	
7	intron2	F	CATTTCCCAGACCTCACCAT	56196253-56196234	6
		R	AAATGGACACACGGCAAGTT	56195745-56195726	
8	exon3A	F	CTTGCTTGGGGGCATAGAT	56195920-56195902	
		R	TCCAGTCTCAGCTCTCTCC	56195420-56195401	
9	intron3A	F	GTGGCAACTGGGTCCTTACA	56195531-56195512	
		R	GTCTCCAGGCGTACTGTGT	56195321-56195302	
10	exon4	F	GGAGAGAGCTGAGGACTGGA	56195420-56195401	7
		R	TTTGCCAATAGCTTGGGTTC	56195010-56194991	
11	intron4	F	AGAAGTGCACCGTCTCAGG	56195108-56195090	
		R	GTGGGGGAGAAGGTGCTTA	56194719-56194701	
12	intron4	F	CAGGGGGACACAGTTTCACT	56194650-56194631	
		R	AAGAGGGAGCTAGGACTGCTG	56194277-56194257	
13	intron4	F	AATCTCTGCCTCCTGGGTTT	56194585-56194566	8,9
		R	CGCAAACGTCTCATCCAAA	56194070-56194051	
14	intron4	F	TCAAGGAGCTTCTCCAGGAA	56194142-56194123	10,11
		R	TTGAAGGTGGAATTGATCTTTTT	56193628-56193606	
15	intron4	F	TGTTGAATGGATGACCTGATG	56193811-56193791	12,13
		R	ACTTGGAGGTGCCCTTTAT	56193247-56193228	
16	intron4	F	GGAGGAGGTGACACTTGGA	56193343-56193324	14
		R	GCACAGACCATGCCATCTG	56192868-56192850	
17	exon5	F	AGGCAAAGGGCTGCTCTC	56193001-56192984	

		R	AACCTCGAGAGGGCAATGA	56192781-56192763	
18	intron5	F	CCCCAGAAGAAGTGTGAGGA	56192908-56192889	15,16,17
		R	AAAGTCGGCACAAATTCCAC	56192459-56192440	
19	intron5	F	CAGATCACAGATGGCATGGT	56192875-56192856	
		R	CAGCCTTGGGATTCTAGCC	56192400-56192382	
20	intron5	F	GTGGAATTTGTGCCGACTTT	56192459-56192440	18
		R	ATCGCTGATGGAAACGACTC	56192114-56192095	
21	intron5	F	CACTTTCCCCTGGCTTTGT	56192212-56192194	19
		R	CCAAGAGACCATGGCTGAA	56192033-56192015	
22	intron5	F	CCTTTCTCCTATGTTTGGCAAC	56191945-56191924	20
		R	CACTTGAAGTCAGGCGTTCC	56191599-56191580	
23	intron5	F	AGCCTCTGCCTCCCAGTT	56191738-56191721	21
		R	TTGGTATAGACGCCAGGTTTG	56191199-56191179	
24	intron5	F	CACCACCACACCAGCTA	56191670-56191653	
		R	TTGGTATAGACGCCAGGTTTG	56191199-56191179	
25	exon6	F	CTACAGGGGACCAATCATGC	56191390-56191370	22
		R	CCTAGTCTGCCAGCAGGAAC	56191021-56191002	
26	3' flanking region	F	CAGATGCAAGGCTGTTCTCA	56191316-56191297	23,24
		R	GGGGGAAAATTTTATCTCCAA	56190790-56190770	
27	3' flanking region	F	GGCAGACTAGGTGGGGATG	56191012-56190994	25,26,27,28
		R	CCACCATACCTGGCACAATTA	56190441-56190421	

wild 型 (G/G)



ヘテロ型 (G/A)



変異型 (A/A)

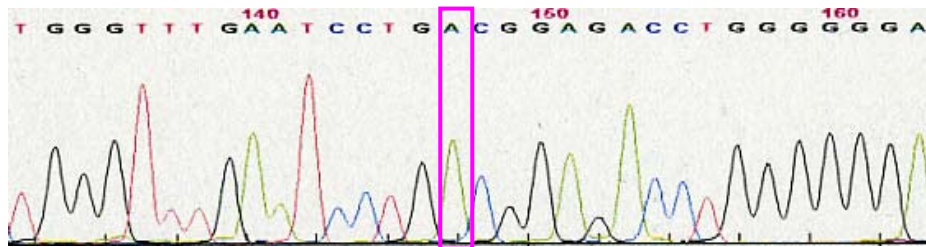


図 1 : SNP のシーケンス波形

ピンク枠: SNP。ヘテロ型は 2 重になっている。

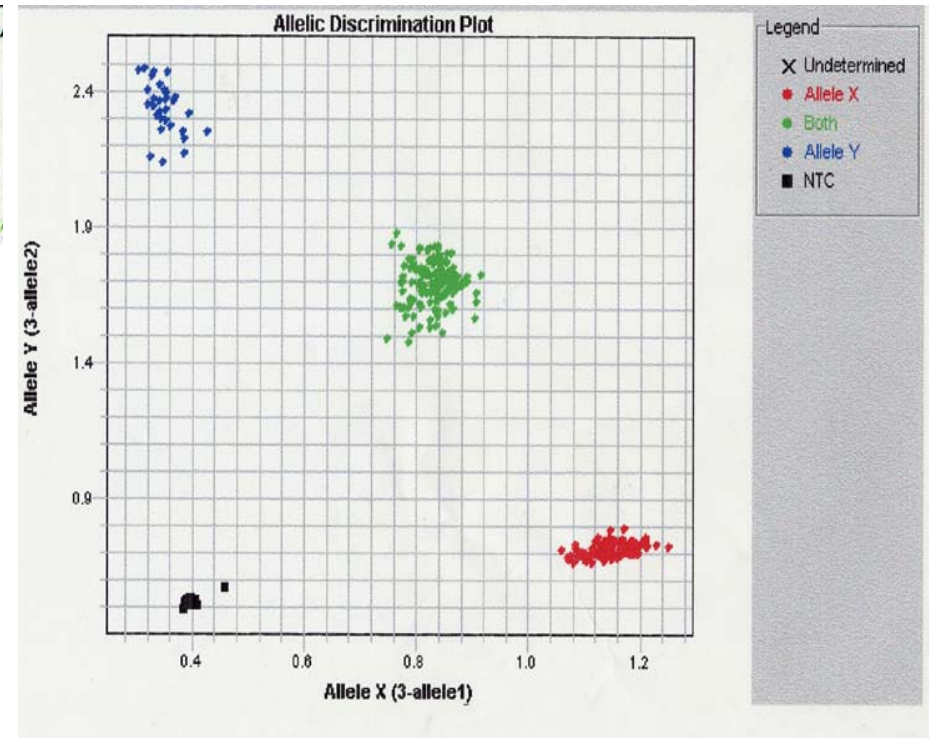


図 2 : 遺伝子型 (genotype) の決定

赤、青プロットはそれぞれ 2 種類のホモに相当し、
緑プロットはヘテロに相当する。

■は No Template Control である。

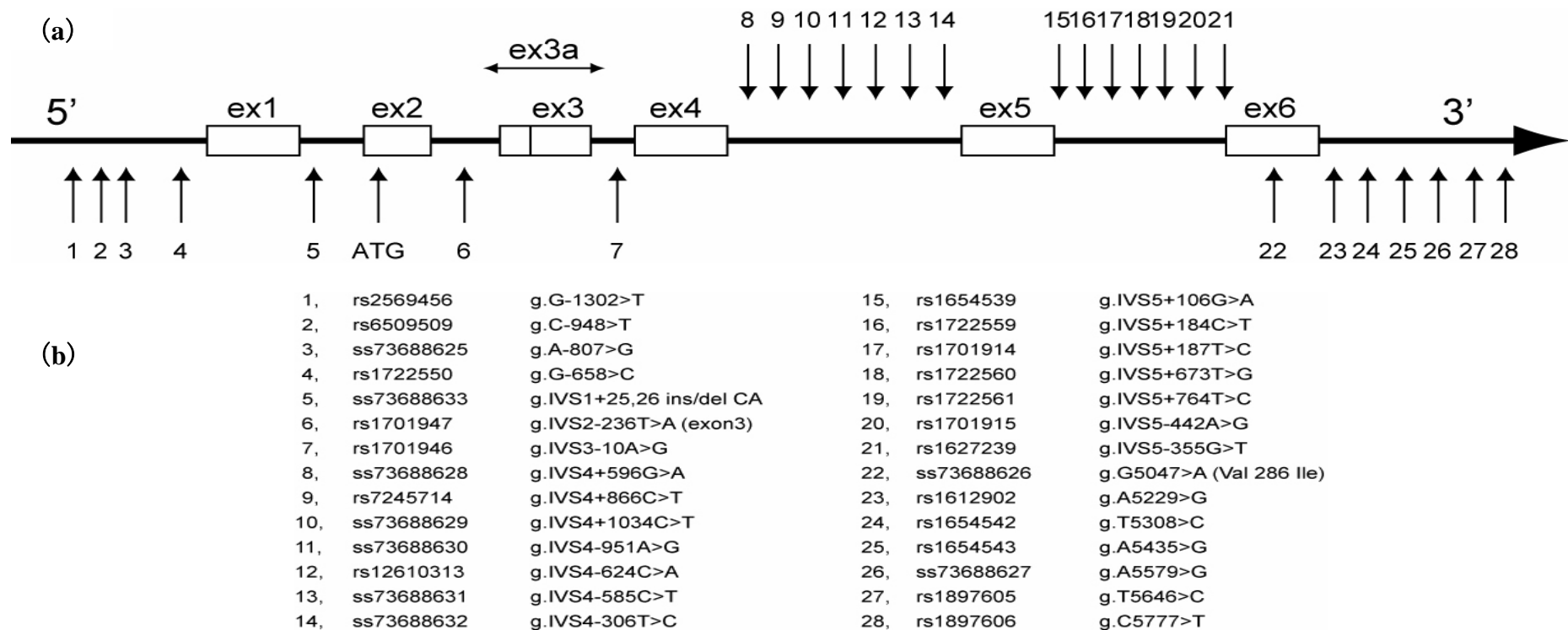


図 3 : Human neuropsin (*hNP*) 遺伝子上に 28 個の SNPs を同定した

(a) *hNP* 遺伝子構造と SNPs の位置

hNP 遺伝子は 6 個の exon を持つ。矢印 1~28 : 今回同定した SNPs の位置。

ex : exon、ex3a : Human neuropsin 遺伝子 Type2 (splicing valiant) の exon3 を表し、Type1 の exon3 より 5'上流が 135bp 長い。

(b) SNP1~28 の詳細

rs 番号および ss 番号 : dbSNP データベース (NCBI) に登録されている各 SNPs の表記番号。ss 番号は、今回新規登録した SNPs である。

g : exon 以外のゲノム上に存在、IVS : intervening sequence、ins/del : insertion/deletion、数字 : 翻訳開始点 ATG の A を+1 とした場合のゲノム上の位置を表す。

例えば、1 : g.G-1302>T は、ATG の A より上流 1302bp のゲノム上に存在し、G が Major allele、T が Minor allele を表す。

7 : g.IVS3-10A>G は、intron3 の 3' splice acceptor site から上流 10bp にあり、A が Major allele で G が Minor allele を表す。

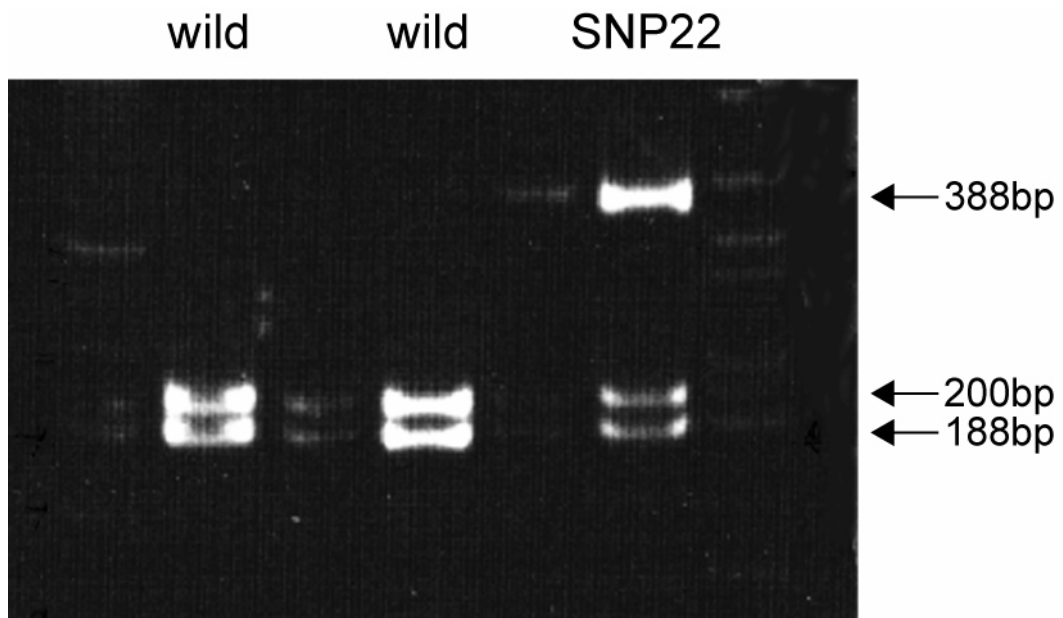


図 4 : Exon6 にある SNP22 の制限酵素断片長多型 (RFLP) 解析

制限酵素: *Acy I* を使用。

正常アレルのみを持つ人 (wild) では、切断された DNA バンド 200bp と 188bp のみが確認された。SNP22 を持つ人では、ヘテロ型の SNP であったため、切断された DNA バンド 200bp、188bp と未切断 DNA バンド 388bp が検出された。

SNP	Diagnosis	N	Genotype frequency (GF)			Allele frequency (AF)		Odds ratio (95% CI)	χ^2 -test v. controls		
			A/A	A/G	G/G	A	G		GF vs HW	GF (df=2)	AF (df=1)
SNP3	Controls	696	462(.66)	208(.30)	26(.04)	1132(.81)	260(.19)		0.67		
	SZ	421	277(.66)	126(.30)	18(.04)	680(.81)	162(.19)	1.06 (0.85-1.33)	0.45	$\chi^2=0.21$ $P=0.90$	$\chi^2=0.11$ $P=0.74$
	MD	382	276(.72)	90 (.24)	16(.04)	642(.84)	122(.16)	1.18 (0.93-1.51)	0.02	$\chi^2=4.94$ $P=0.08$	$\chi^2=2.48$ $P=0.12$
	BD	202	139(.69)	56 (.28)	7 (.03)	334 (.83)	70 (.17)	1.09 (0.82-1.46)	0.65	$\chi^2=0.4$ $P=0.81$	$\chi^2=0.36$ $P=0.54$
SNP4	Controls	683	388(.57)	243(.36)	52(.08)	1019(.75)	347(.25)		0.11		
	SZ	406	234(.58)	150(.37)	22(.05)	618(.76)	194(.24)	1.1 (0.90-1.36)	0.75	$\chi^2=1.97$ $P=0.37$	$\chi^2=0.62$ $P=0.43$
	MD	371	219(.59)	126(.34)	26(.07)	564(.76)	178(.24)	1.1 (0.89-1.36)	0.19	$\chi^2=0.5$ $P=0.78$	$\chi^2=0.58$ $P=0.47$
	BD	198	91(.46)	90 (.45)	17(.09)	272 (.69)	124(.31)	1.33 (1.04-1.7)	0.43	$\chi^2=7.47$ $P=0.023$	$\chi^2=5.35$ $P=0.019$
SNP6	Controls	711	316(.44)	306(.43)	89(.13)	938(.66)	484(.34)		0.27		
	SZ	422	195(.46)	192(.45)	35(.08)	582(.69)	262(.31)	1.17 (0.97-1.41)	0.20	$\chi^2=4.86$ $P=0.09$	$\chi^2=2.15$ $P=0.14$
	MD	378	171(.45)	164(.43)	43(.11)	506(.67)	250(.33)	1.06 (0.88-1.29)	0.70	$\chi^2=0.31$ $P=0.86$	$\chi^2=0.21$ $P=0.65$
	BD	197	70 (.36)	99 (.50)	28(.14)	239(.61)	155(.39)	1.25 (0.99-1.58)	0.46	$\chi^2=5.03$ $P=0.08$	$\chi^2=3.8$ $P=0.051$
SNP7	Controls	718	325(.45)	314(.44)	79(.11)	964(.67)	472(.33)		0.81		
	SZ	433	209(.48)	190(.44)	34(.08)	608(.70)	258(.30)	1.16 (0.96-1.40)	0.31	$\chi^2=3.26$ $P=0.20$	$\chi^2=2.36$ $P=0.12$
	MD	387	182(.47)	163(.42)	42(.11)	527(.68)	247(.32)	1.05 (0.87-1.28)	0.55	$\chi^2=0.33$ $P=0.85$	$\chi^2=0.21$ $P=0.65$
	BD	203	72 (.35)	103(.51)	28(.14)	247(.61)	159(.39)	1.31 (1.04-1.65)	0.36	$\chi^2=6.3$ $P=0.042$	$\chi^2=5.56$ $P=0.018$
SNP23	Controls	714	428(.60)	241(.34)	45(.06)	1097(.77)	331(.23)		0.16		
	SZ	421	267(.63)	135(.32)	19(.05)	669(.79)	173(.21)	1.17 (0.94-1.44)	0.71	$\chi^2=2.25$ $P=0.32$	$\chi^2=2.13$ $P=0.14$
	MD	388	240(.62)	127(.33)	21(.05)	607(.78)	169(.22)	1.08 (0.87-1.34)	0.44	$\chi^2=0.56$ $P=0.75$	$\chi^2=0.56$ $P=0.45$
	BD	204	98 (.48)	86 (.42)	20(.10)	282 (.69)	126(.31)	1.48 (1.16-1.88)	0.86	$\chi^2=9.82$ $P=0.0073$	$\chi^2=10.07$ $P=0.0015$

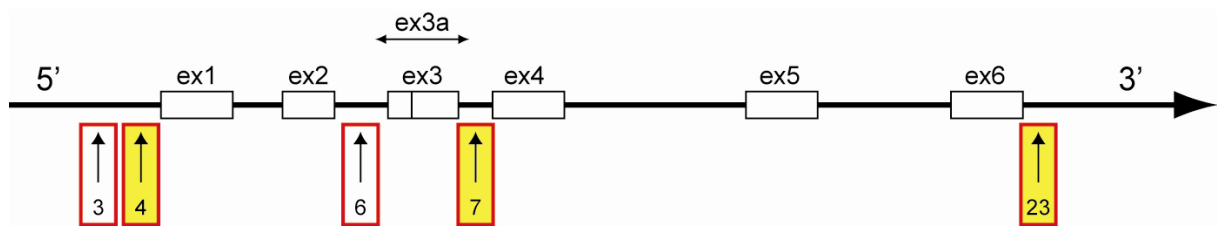
表 2：統合失調症・単極性うつ病・躁うつ病と健常対照群における遺伝子型頻度と対立遺伝子頻度の分布および関連解析

SNP4、SNP7、SNP23 において、躁うつ病－健常対照群間で遺伝子型頻度、対立遺伝子頻度に有意な差が見られた (図 5 参照)。

Genotype frequency: 遺伝子型頻度、Allele frequency: 対立遺伝子頻度、HW: ハーディ・ワインベルグの平衡法則、df: 自由度、95%CI: 95% 信頼区間、Controls: 健常対照者、SZ: Schizophrenia 統合失調症、MD: Major depression 単極性うつ病、BD: Bipolar disorder 躁うつ病、グレー部分は、 $p < 0.05$ を示す。

(a)

hNP 遺伝子



(b)

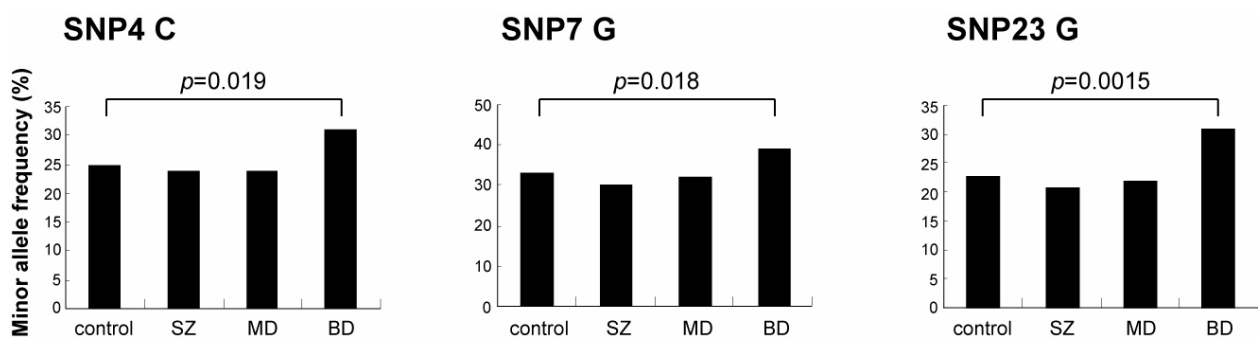


図 5 : 躁うつ病患者群では、SNP4、SNP7、SNP23 のマイナーアレル頻度が健常対照群に比べて有意に高かった。

(a) 患者－健常対照群間比較関連解析を行った SNPs

hNP 遺伝子構造と SNPs 情報は、図 3 を参照。

赤枠の数字：関連解析を行った SNP。

赤枠黄色づけ数字：躁うつ病－健常対照群間において対立遺伝子頻度に有意な差がみられた SNP。

(b) 健常対照者群、統合失調症、単極性うつ病、躁うつ病における SNP4、SNP7、SNP23 のマイナーアレル頻度

躁うつ病患者群では有意に各 SNPs のマイナーアレル；SNP4 C、SNP7 G、SNP23 G の出現頻度が高くなっていた。

Control: 健常対照者、SZ: Schizophrenia 統合失調症、

MD: Major depression 単極性うつ病、BD: Bipolar disorder 躁うつ病

SNP	Diagnosis	N	Genotype frequency(GF)		χ^2 -test (df=1)	Genotype frequency(GF)		χ^2 -test (df=1)	Odds ratio (95% CI)
SNP3			A/A , A/G	G/G		A/A	A/G , G/G		
	Controls	696	670(.96)	26(.04)	$\chi^2=0.03$	462(.66)	234 (.33)	$\chi^2=0.42$	1.12
	BD	202	195(.97)	7(.03)	$P=0.86$	139 (.69)	63 (.31)	$P=0.52$	(0.80-1.56)
SNP4			G/G , G/C	C/C		G/G	G/C , C/C		
	Controls	683	631(.92)	52(.08)	$\chi^2=0.20$	388 (.57)	295 (.43)	$\chi^2=7.28$	1.55
	BD	198	181(.91)	17(.09)	$P=0.65$	91 (.46)	107(.54)	$P=0.007$	(1.12-2.12)
SNP6			T/T , T/A	A/A		T/T	T/A , A/A		
	Controls	711	622(.87)	89(.13)	$\chi^2=0.40$	316(.44)	395(.56)	$\chi^2=5.01$	1.45
	BD	197	169(.86)	28(.14)	$P=0.53$	70 (.36)	127 (.64)	$P=0.03$	(1.04-2.01)
SNP7			A/A , A/G	G/G		A/A	A/G , G/G		
	Controls	718	639(.89)	79(.11)	$\chi^2=1.2$	325(.45)	393(.55)	$\chi^2=6.19$	1.50
	BD	203	175(.86)	28(.14)	$P=0.27$	72 (.35)	131 (.65)	$P=0.01$	(1.08-2.07)
SNP23			A/A , A/G	G/G		A/A	A/G , G/G		
	Controls	714	669(.94)	45(.06)	$\chi^2=2.96$	428 (.60)	286 (.40)	$\chi^2=9.19$	1.61
	BD	204	184(.90)	20(.10)	$P=0.09$	98 (.48)	106(.52)	$P=0.002$	(1.18-2.21)

表 3 : 躁うつ病と健常対照群間における遺伝子型頻度および関連解析

Major allele-homo 型、Minor allele-carrier 型に分けた場合 (右側)、SNP4、SNP6、SNP7、SNP23 において遺伝子型頻度に有意な差が得られた。

Genotype frequency: 遺伝子型頻度、df: 自由度、95%CI: 95%信頼区間、Controls: 健常対照者、BD: Bipolar disorder 躁うつ病
グレー部分は、 $p < 0.05$ を示す。

(a) 連鎖不平衡係数値

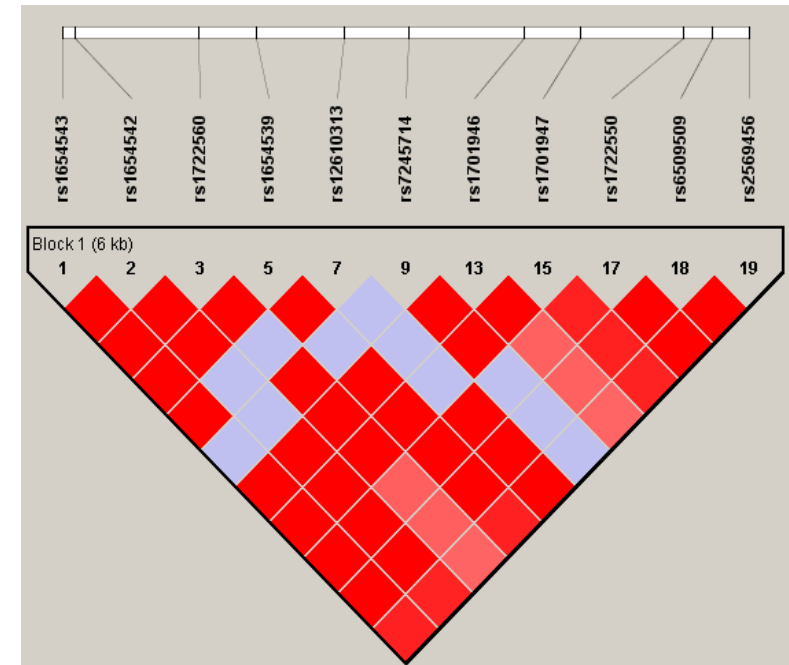
健常対照群

SNP	1	2	4	6	7	9	12	15	18	24	25
1		0.94	0.94	0.572	0.446	0.03	0.193	0.701	0.45	0.689	0.701
2		1		0.614	0.486	0.033	0.181	0.771	0.49	0.763	0.771
4			1	0.614	0.486	0.033	0.181	0.771	0.49	0.763	0.771
6				0.923	0.927	0.927		0.898	0.214	0.129	0.551
7				0.772	0.782	0.782	1		0.238	0.144	0.613
9				1	1	1		1	0.006	0.024	0.24
12				1	1	1	1		0.235	0.145	0.199
15				1	1	1	1	1		0.615	1
18				0.775	0.785	0.785	1	1	1		0.603
24				0.92	1	1	1	1	1	1	
25				0.924	1	1	1	1	1	1	1

r^2

D'

(b) 連鎖不平衡ブロック



Haploview program version 3.11

図 6 : 連鎖不平衡係数値および連鎖不平衡ブロック

HapMap project データベースから日本人 45 人の SNPs 情報を抽出し、Haploview プログラムにより算出した。

(a) 連鎖不平衡係数値

D' : 連鎖不平衡係数、 r^2 : 相関係数、
グレー部分は 0.8 以上の値を示し、連鎖が強い。

(b) 連鎖不平衡ブロック

赤色が濃いほど D' と r^2 値が高く、強い連鎖を示す。
SNPs (rs 番号) の情報は、図 3 を参照。

(a)、(b) より、*hNP* 遺伝子が一つの連鎖不平衡ブロックに存在することが明らかとなった。

Markers					Haplotype frequency			P-value	
SNP3	SNP4	SNP6	SNP7	SNP23	SZ	Controls	Individual	Global*	Overall global*
A	C				0.24	0.26	0.38	0.65	
	C	A			0.22	0.24	0.28	0.65	
		T	A		0.69	0.66	0.11	0.53	
			A	A	0.7	0.67	0.1	0.33	0.75
A	C	A			0.22	0.24	0.26	0.82	
	C	A	G		0.2	0.23	0.214	0.97	
		T	A	A	0.69	0.66	0.08	0.6	0.75

(a) 統合失調症-健常対照群間におけるハプロタイプ解析 (SZ: 統合失調症)

Markers					Haplotype frequency			P-value	
SNP3	SNP4	SNP6	SNP7	SNP23	MD	Controls	Individual	Global*	Overall global*
A	G				0.6	0.55	0.04	0.11	
	C	A			0.23	0.24	0.54	0.91	
		T	A		0.67	0.66	0.5	1	
			G	G	0.22	0.23	0.47	0.89	0.3
A	G	T			0.5	0.46	0.07	0.36	
	G	T	A		0.66	0.65	0.49	0.99	
		T	A	A	0.67	0.66	0.47	1	0.68

(b) 単極性うつ病-健常対照群間におけるハプロタイプ解析 (MD: 単極性うつ病)

Markers					Haplotype frequency			P-value	
SNP3	SNP4	SNP6	SNP7	SNP23	BD	Controls	Individual	Global*	Overall global*
A	C				0.31	0.26	0.028	0.073	
	C	A			0.30	0.24	0.030	0.10	
		A	G		0.39	0.33	0.028	0.11	
			G	G	0.30	0.23	0.0068	0.014	0.083
A	C	A			0.3	0.24	0.04	0.19	
	C	A	G		0.29	0.23	0.02	0.31	
		A	G	G	0.3	0.23	0.008	0.08	0.13
	C		G	G	0.29	0.23	0.01	0.06	

(c) 躁うつ病-健常対照群間におけるハプロタイプ解析 (BD: 躁うつ病)

表 4: 統合失調症・単極性うつ病・躁うつ病と健常対照群におけるハプロタイプ解析
 2SNPs および 3SNPs からなるハプロタイプにおいて比較関連解析を行った。躁うつ病-健常対照群間では、どの組み合わせハプロタイプにおいても有意に患者群で多く出現しているハプロタイプがあった。全て COCAPHASE software ver 2.4 を用いて算出した。COCAPHASE で使用したオプションは、-EM, -droprare, -rare 0.03, -individual であり、Global*-*p* 値および Overall global*-*p* 値算出時はオプション -permutaiton 10000 も用いた。グレー部分は、*p* < 0.05 を示す。Control: 健常対照者

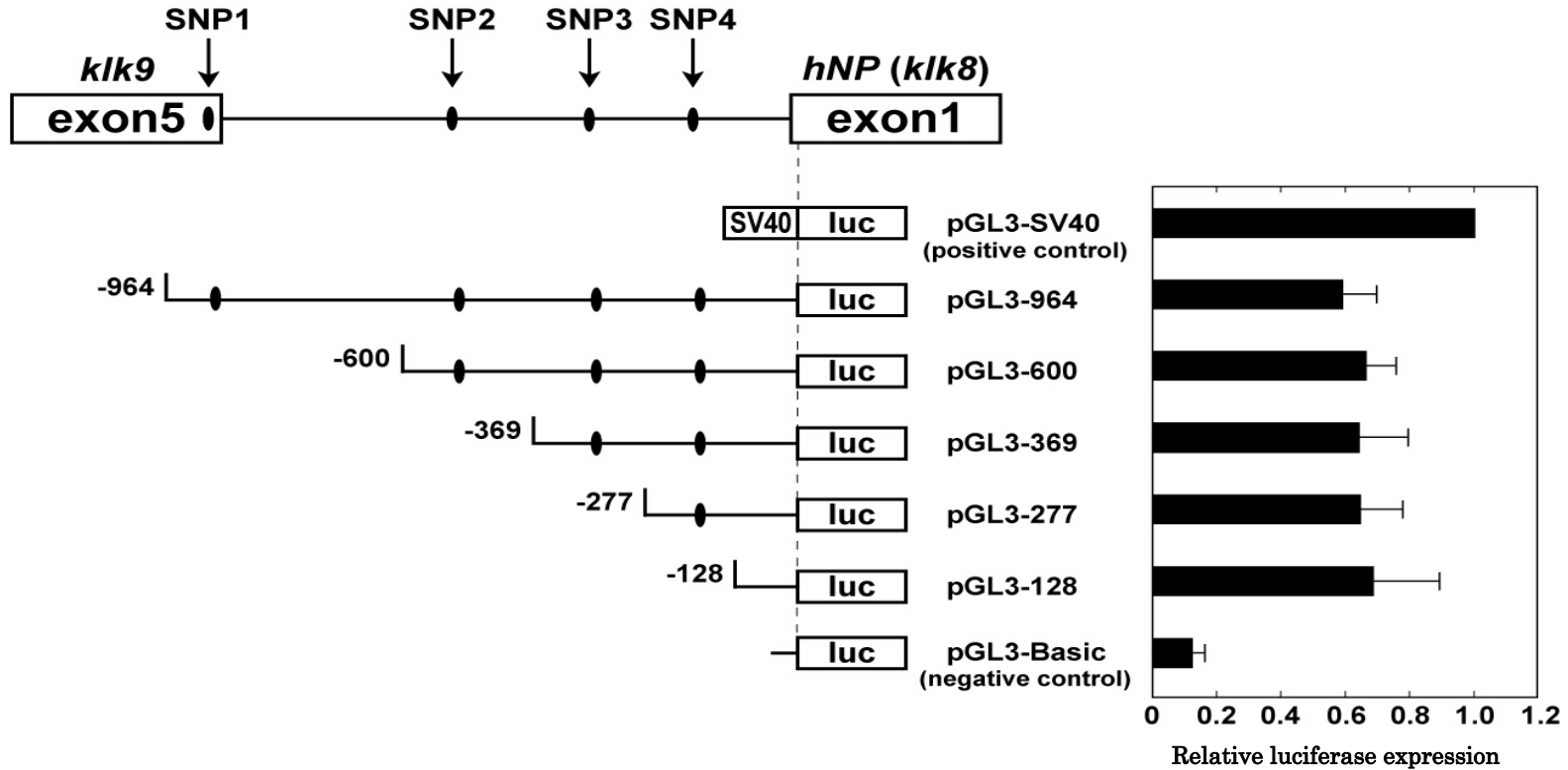


図 7 : 含まれる SNPs の数によって転写活性に差はなかった

hNP 遺伝子上流を含む 5 種類のコンストラクトをラット初代培養大脳皮質ニューロンに導入し、ルシフェラーゼアッセイ法により転写活性測定を行った。*klk8* (*kallikrein8*) は、*hNP* 遺伝子の別名である。*hNP* 遺伝子上流に *klk9* (exon を 5 個もつ) が存在する。

pGL3-964: (SNP1-2-3-4; G-C-A-G を含む 964bp)、pGL3-600: (SNP2-3-4; C-A-G を含む 600bp)、pGL3-369: (SNP3-4; A-G を含む 369bp)、pGL3-277: (SNP4; G を含む 277bp)、pGL3-128: (SNP を含まない 128bp)、pGL3-SV40 (SV40 promoter をもつ): ポジティブコントロール、pGL3-Basic: ネガティブコントロール。含まれる SNPs は、全てメジャーアレルである。転写活性値は、pGL3-SV40 の値で標準化した。(N=24)

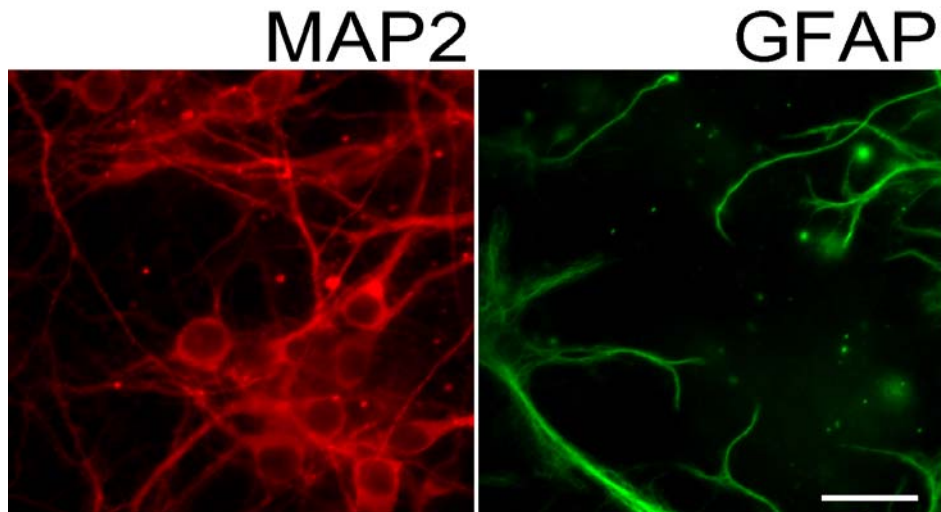


図 8 : ラット初代培養大脳皮質ニューロン

ラット大脳皮質より分散培養した細胞を抗 MAP2 (赤、ニューロン特異的マーカー) と抗 GFAP (緑、アストログリアマーカー) 抗体を用いて免疫染色を行った。この免疫染色写真は同視野における二重染色の結果を示している。

Bar=50 μ m.

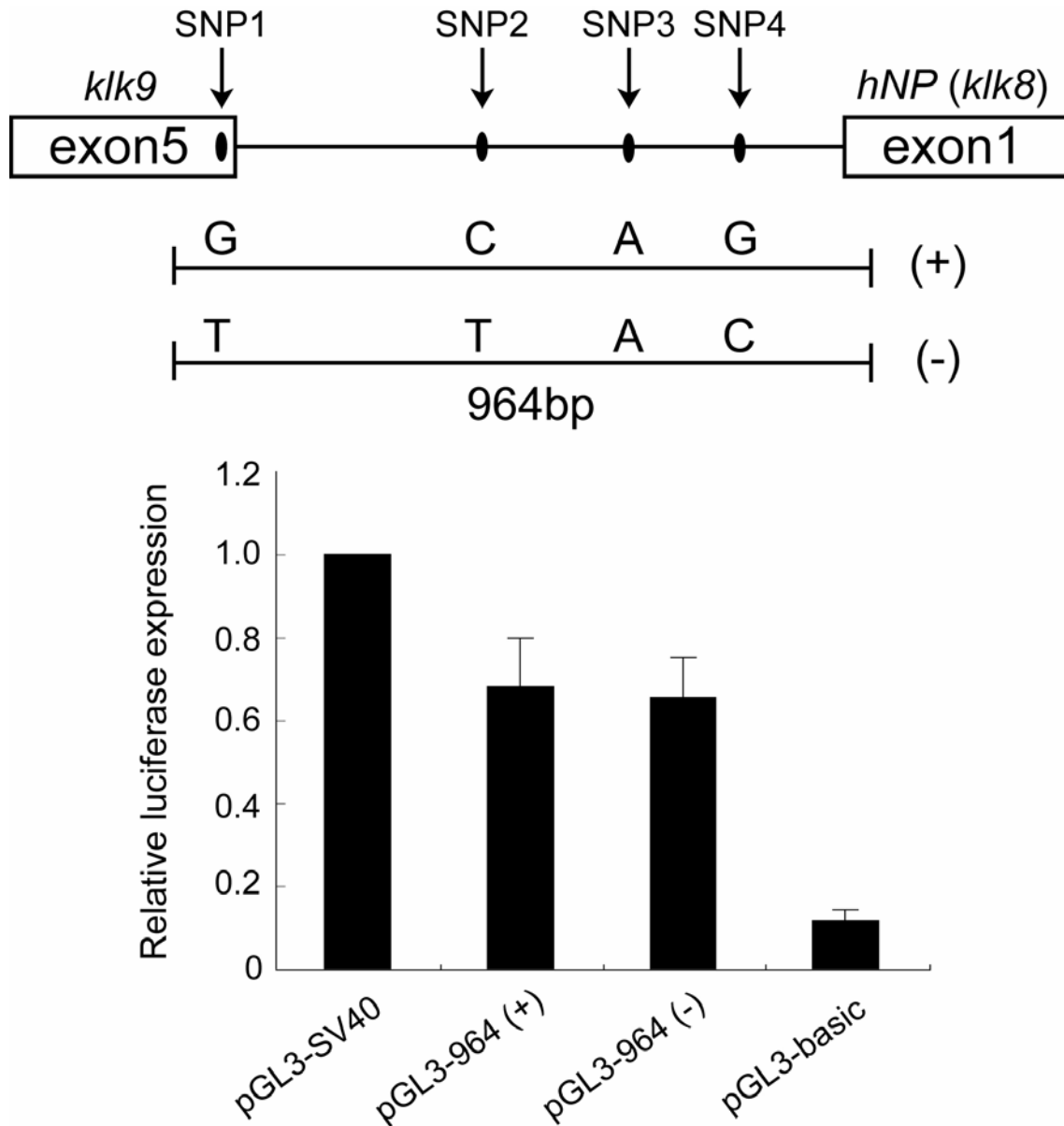


図 9：上流 SNPs (SNP1-2-3-4) の対立遺伝子間において転写活性に差は見られなかった

メジャーアレル型 (SNP1-2-3-4; G-C-A-G) ; pGL3-964 (+) とマイナーアレル型 (SNP1-2-3-4; T-T-A-C) ; pGL3-964 (-) の 2 種類のコンストラクトをラット初代培養大脳皮質ニューロンに導入し、ルシフェラーゼアッセイ法により比較した。

pGL3- SV40 (SV40 promoter をもつ) : ポジティブコントロール、pGL3-Basic : ネガティブコントロール。転写活性値は、pGL3-SV40 の値で標準化した。(N=24)

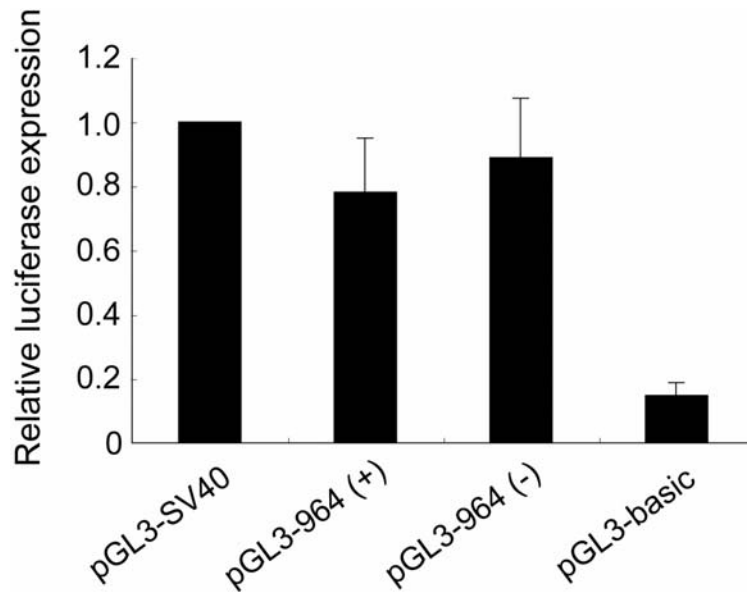


図 10：ラット初代培養海馬ニューロンを用いた場合でも、上流 SNPs (SNP1-2-3-4) の対立遺伝子間において転写活性に差は見られなかった

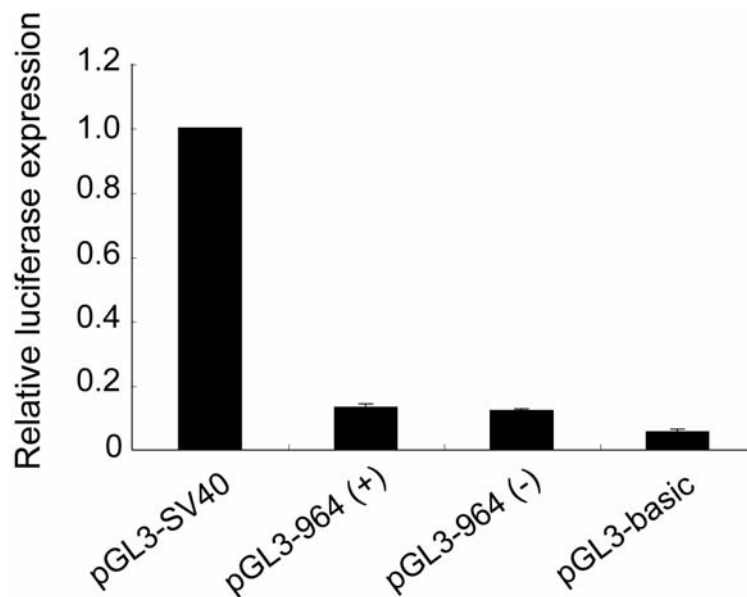
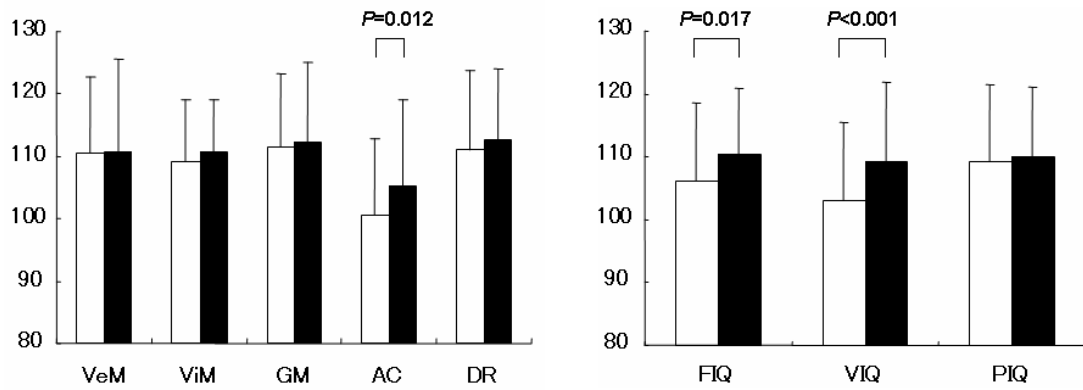


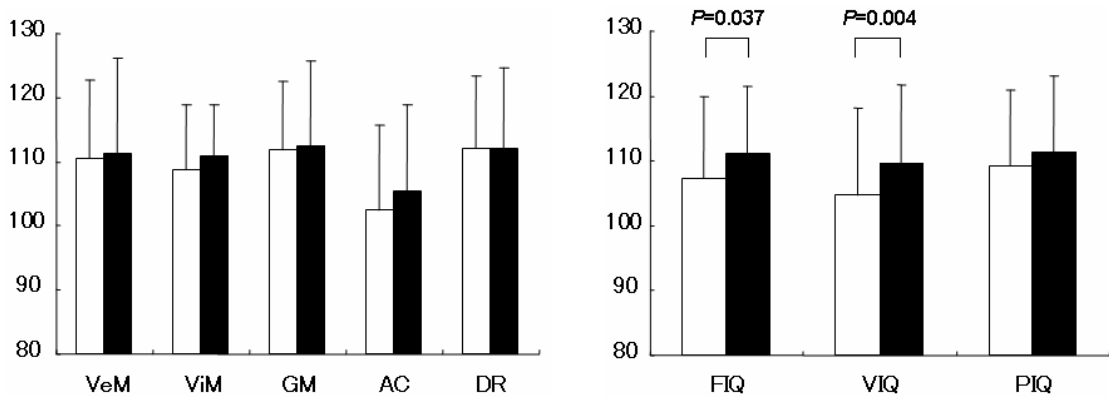
図 11：ヒト Neuroblastoma 培養細胞 (IMR-32) を用いた場合でも、上流 SNPs (SNP1-2-3-4) の対立遺伝子間において転写活性に差は見られなかった

メジャーアレル型 (SNP1-2-3-4; G-C-A-G) ; pGL3-964 (+) とマイナーアレル型 (SNP1-2-3-4; T-T-A-C) ; pGL3-964 (-) の2種類それぞれをラット初代培養海馬ニューロン (図 10)、ヒト Neuroblastoma 培養細胞 IMR-32 (図 11) に導入し、ルシフェラーゼアッセイ法により比較した。pGL3-SV40 (SV40 promoter をもつ) : ポジティブコントロール、pGL3-Basic : ネガティブコントロール。転写活性値は、pGL3-SV40 の値で標準化した。(図 10 ; N=16、図 11 ; N=4)

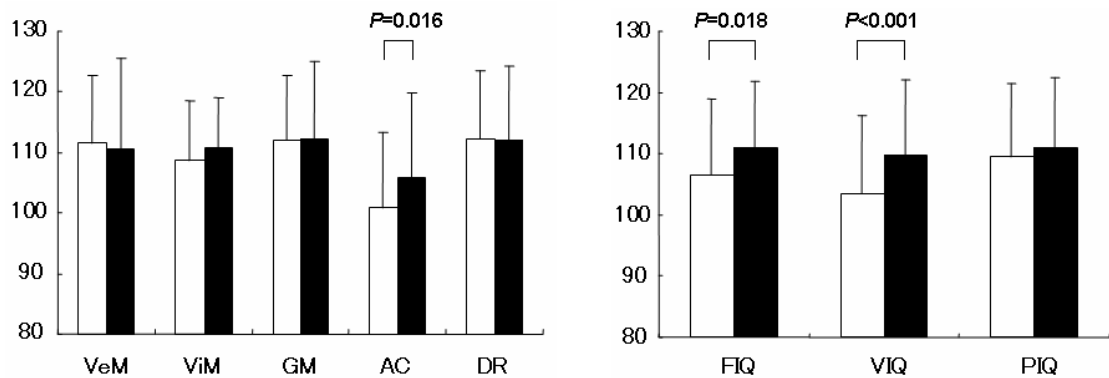
SNP4



SNP7



SNP23

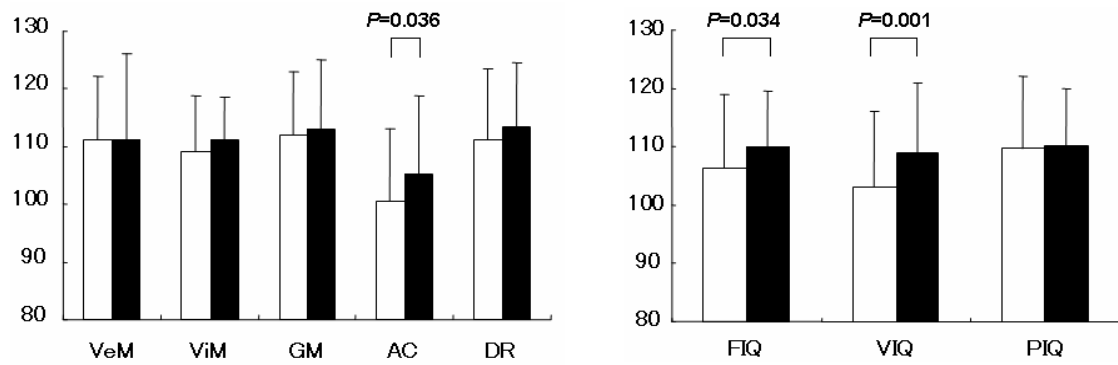


WMS-R			WAIS-R		
VeM	verbal memory	言語性記憶	FIQ	full-IQ	全IQ
ViM	visual memory	視覚性記憶	VIQ	verbal IQ	言語性IQ
GM	general memory	一般的記憶	PIQ	performance IQ	動作性IQ
AC	attention and concentration	注意・集中力			
DR	delayed recall	遅延再生			

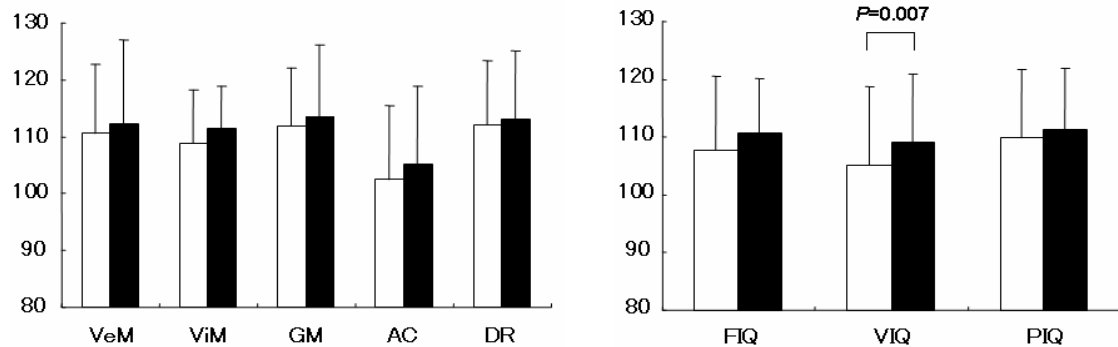
図 12 : SNP4、SNP7、SNP23 の Minor allele-carrier 群では、注意・集中力、全 IQ および言語性 IQ のスコアが有意に低かった

白 : Minor allele-carrier 群、黒 : Major allele-homo 群

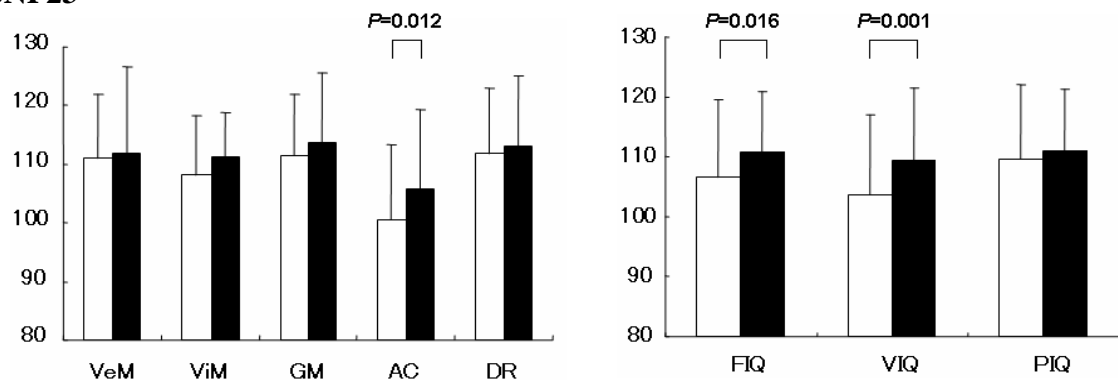
SNP4



SNP7



SNP23



WMS-R			WAIS-R		
VeM	verbal memory	言語性記憶	FIQ	full-IQ	全IQ
ViM	visual memory	視覚性記憶	VIQ	verbal IQ	言語性IQ
GM	general memory	一般的記憶	PIQ	performance IQ	動作性IQ
AC	attention and concentration	注意・集中力			
DR	delayed recall	遅延再生			

図 13 : アルツハイマー病の危険因子 *ApoE* の $\epsilon 4$ を持たない、 $\epsilon 3 \epsilon 3$ 遺伝子型の対象者においても、SNP4、SNP7、SNP23 の Minor allele-carrier 群では、注意・集中力、全 IQ および言語性 IQ のスコアが有意に低かった
 白 : Minor allele-carrier 群、黒 : Major allele-homo 群

SNP	Diagnosis	N	Genotype frequency(GF)			Allele frequency(AF)		Odds ratio (95% CI)	χ ² - test		
			GF vs HW	GF(df=2)	AF(df=1)						
SNP3			A/A	A/G	G/G	A	G				
	Controls	751	506(.67)	227(.30)	18(.02)	1239(.82)	263(.18)	1.03	0.2	χ ² =1.76	χ ² =0.12
	Alzheimer	749	512(.68)	219(.29)	18(.02)	1243(.83)	255(.17)	(0.86-1.25)	0.33	P=0.92	P=0.72
SNP4			G/G	G/C	C/C	G	C				
	Controls	752	441(.59)	272(.36)	39(.05)	1154(.77)	350(.23)	1.22	0.73	χ ² =6.05	χ ² =5.55
	Alzheimer	750	393(.52)	309(.41)	48(.06)	1095(.73)	405(.27)	(1.03-1.44)	0.22	P=0.048	P=0.018
SNP6			T/T	T/A	A/A	T	A				
	Controls	747	357(.48)	313(.42)	77(.10)	1027(.69)	467(.31)	1.15	0.5	χ ² =4.38	χ ² =3.30
	Alzheimer	752	319(.42)	349(.46)	84(.11)	987(.66)	517(.34)	(0.99-1.34)	0.43	P=0.11	P=0.07
SNP7			A/A	A/G	G/G	A	G				
	Controls	744	370(.5)	301(.4)	73(.1)	1041(.7)	447(.3)	1.14	0.31	χ ² =4.8	χ ² =2.84
	Alzheimer	746	330(.44)	341(.46)	75(.1)	1001(.67)	491(.33)	(0.98-1.33)	0.34	P=0.09	P=0.09
SNP23			A/A	A/G	G/G	A	G				
	Controls	749	470(.63)	245(.33)	34(.05)	1185(.79)	313(.21)	1.23	0.77	χ ² =6.07	χ ² =5.53
	Alzheimer	745	421(.57)	283(.38)	41(.06)	1125(.76)	365(.24)	(1.03-1.45)	0.46	P=0.048	P=0.018

表 5 : アルツハイマー病と健常対照群における遺伝子型頻度と対立遺伝子頻度の分布および関連解析

<全対象者による解析：全ての ApoE アイソフォームを含む>

SNP4、SNP23 において、アルツハイマー病ー健常対照群間で遺伝子型頻度、対立遺伝子頻度に有意な差が見られた。

Genotype frequency: 遺伝子型頻度、Allele frequency: 対立遺伝子頻度、HW:ハーディ・ワインベルグの平衡法則、df: 自由度、95%CI: 95%信頼区間、Controls: 健常対照者、Alzheimer : アルツハイマー病
グレイ部分は、 $p < 0.05$ を示す。

SNP	Diagnosis	N	Genotype frequency(GF)			Allele frequency(AF)		Odds ratio (95% CI)	χ ² -test		
			GF vs HW	GF(df=2)	AF(df=1)						
SNP3			A/A	A/G	G/G	A	G				
	Controls	530	376(.71)	143(.27)	11(.02)	895(.84)	165(.16)	1.23	0.54	χ ² =2.85	χ ² =2.58
	Alzheimer	346	230(.66)	104(.3)	12(.03)	564(.82)	128(.18)	(0.96-1.59)	0.95	P=0.24	P=0.11
SNP4			G/G	G/C	C/C	G	C				
	Controls	531	306(.58)	194(.37)	31(.06)	806(.76)	256(.24)	1.06	0.97	χ ² =0.49	χ ² =0.28
	Alzheimer	345	191(.55)	134(.39)	20(.06)	516(.75)	174(.25)	(0.85-1.33)	0.58	P=0.78	P=0.60
SNP6			T/T	T/A	A/A	T	A				
	Controls	526	251(.48)	220(.42)	55(.10)	722(.69)	330(.31)	1.06	0.51	χ ² =1.66	χ ² =0.32
	Alzheimer	346	153(.44)	160(.46)	33(.10)	466(.67)	226(.33)	(0.86-1.30)	0.34	P=0.44	P=0.57
SNP7			A/A	A/G	G/G	A	G				
	Controls	525	260(.50)	210(.40)	55(.10)	730(.70)	320(.30)	1.06	0.2	χ ² =3.66	χ ² =0.26
	Alzheimer	343	155(.45)	159(.46)	29(.08)	469(.68)	217(.32)	(0.86-1.30)	0.18	P=0.16	P=0.61
SNP23			A/A	A/G	G/G	A	G				
	Controls	528	327(.62)	173(.33)	28(.05)	827(.78)	229(.22)	1.06	0.42	χ ² =1.71	χ ² =0.28
	Alzheimer	345	203(.59)	127(.37)	15(.04)	533(.77)	157(.23)	(0.84-1.34)	0.38	P=0.43	P=0.60

表 6 : アルツハイマー病と健常対照群における遺伝子型頻度と対立遺伝子頻度の分布および関連解析

<対象者 : ApoE3 アイソフォームのみ持つ人 (ε 3 ε 3 遺伝子型の人) >

アルツハイマー病の危険因子である ApoE の ε 4 を持たない、ε 3 ε 3 遺伝子型の人のみを対象とした場合、有意な差は見られなかった。

Genotype frequency: 遺伝子型頻度、Allele frequency: 対立遺伝子頻度、HW: ハーディ・ワインベルグの平衡法則、df: 自由度、95%CI: 95% 信頼区間、Controls: 健常対照者、Alzheimer : アルツハイマー病